

Tesis Doctoral

**Secuenciación del genoma de 9 aislados del virus ectromelia:
implicaciones evolutivas y determinantes de virulencia**

Carla Nartuhi Mavian

Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid

Codirectores de Tesis: Dr. Alberto López Bueno y Dr. Antonio Alcamí Pertejo

2013



La autora de la Tesis Doctoral ha disfrutado de una ayuda Predoctoral de Formarción de Personal Investigador (referencia BES-2008-002202) asociada al proyecto de Investigación SAF2006-08104.

Índice

Índice

1 Abreviaturas	9
2 Resumen	14
3 Introducción	17
3.1 La familia <i>Poxviridae</i>	18
3.2 El origen de los poxvirus	19
3.3 Evolución de los OPVs	19
3.4 VARV, CPXV y MPXV	21
3.5 VACV y la vacunación	23
3.6 El genoma de los poxvirus	24
3.7 Ciclo viral de los poxvirus	25
3.7.1 Los cuerpos de inclusión de tipo A (ATIs)	26
3.8 Determinantes de virulencia y tropismo de los poxvirus	28
3.8.1 Modulación de la respuesta inmune por poxvirus	28
3.8.1.1 Inhibición del IFN	29
3.8.1.2 Inhibición del factor de necrosis tumoral (TNF)	29
3.8.1.3 Inhibición de quimioquinas	30
3.8.2 Modulación de la ruta ubiquitin-protosoma	30
3.8.2.1 Proteínas anquirinas/F-Box	31
3.8.2.2 Proteínas Kelch/BTB	31
3.8.3 Inhibición de apoptosis	31
3.8.4 Otros mecanismos de inmunomodulación	32
3.9 Historia y biología de ECTV	33
3.9.1 Aislados de ECTV	33
3.9.2 El modelo de mousepox	34
3.9.3 Respuesta inmunológica frente a ECTV	35
3.10 Las tecnologías de secuenciación de ADN: pasado y presente	37
4 Objetivos	40
5 Materiales y Métodos	42
5.1 Línea celular	43
5.2 Virus	43
5.3 Preparación de <i>stocks</i> de virus	44
5.4 Ensayos de formación de placa de lisis	45
5.5 Ensayos de infección <i>in vitro</i> : ciclo único y progresión	45
5.6 Purificación y amplificación de ADN viral	45
5.7 Secuenciación <i>de novo</i>	46
5.8 Ensamblaje del genoma viral	47
5.9 Anotación del genoma	48
5.10 Comparación de los genomas	49
5.11 Análisis filogenético	49
5.12 Microscopía electrónica	49
5.13 Experimentos de infección en ratones	50
5.13.1 Ensayos de dosis letal 50 (DL ₅₀)	50
5.13.2 Ensayos de diseminación viral	51
5.13.3 Ensayos de transmisión viral en ratones	51
5.13.4 Determinación del título viral en los órganos	51
5.13.5 Análisis estadístico	51
6 Resultados	54
6.1 Análisis y comparación del genoma de aislados de ECTV	55
6.1.1 Pirosecuenciación del genoma de 10 aislados de ECTV	55
6.1.2 Estimación por PCR del tamaño de la zona repetida y corrección de homopolímeros ..	57
6.1.3 Secuenciación del genoma de ECTV-Naval por Illumina	58
6.1.4 Comparación de la secuencia de nucleótidos de los genomas	59
6.1.5 Relaciones filogenéticas	62
6.2 Actualización de la anotación del genoma de ECTV-Naval	64
6.2.1.1 Genes de replicación del ADN y de transcripción	70

6.2.1.2	Proteínas implicadas en la entrada del virus en la célula	70
6.2.1.3	Genes implicados en procesos de morfogénesis	70
6.2.2	Genes y pseudogenes de evasión de la respuesta inmune y determinantes del rango de hospedador	73
6.2.2.1	Inhibición de citoquinas y quimioquinas	73
6.2.2.2	Proteínas de la familia Bcl-2	74
6.2.2.3	Proteínas tipo anquirina y kelch	75
6.2.2.4	Otros genes y pseudogenes	76
6.3	Comparación del contenido génico de los aislados de ECTV	77
6.3.1	Los aislados ECTV-Cornell, ECTV-Naval y ERPV	77
6.3.2	ECTV-Hampstead y ECTV-Moscow	78
6.3.3	Los aislados atenuados	79
6.3.3.1	ECTV-Ishibashi	79
6.3.3.2	ECTV-Hampstead Egg	79
6.3.3.3	ECTV-Mill Hill	80
6.3.4	Los aislados del clado centroeuropeo	80
6.3.5	Variabilidad del gen de la P4c en los aislados de ECTV	81
6.5	Caracterización de los aislados de ECTV <i>in vitro</i>	86
6.5.1	Morfología y progresión de las placas de lisis	86
6.5.2	Ensayo de progresión de la infección <i>in vitro</i>	86
6.5.3	Cinética de infección	86
6.5.4	Formación de ATIs	88
6.6	Caracterización de la virulencia de los aislados de ECTV <i>in vivo</i>	90
6.6.1	Comparación de la infección con ECTV en ratones de diferente procedencia	90
6.6.2	Comparación de la virulencia de los aislados de ECTV	91
6.6.2.1	Los aislados atenuados	91
6.6.2.2	Los aislados virulentos	93
6.6.2.3	Aislados de virulencia intermedia	94
6.7	Diseminación y transmisión <i>in vivo</i> de los aislados ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead	99
6.7.1	Diseminación de ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead en ratones BALB/c	99
6.7.2	Transmisión de ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead entre ratones en contacto	101
6.7.3	Transmisión en ausencia de contacto	101
6.8	Análisis de los aislados VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1	103
6.8.1	Comparación de los genomas y relación filogenética	103
6.8.2	Infección de ratones BALB/c con WAU88-1	105
7	Discusión	107
7.1	Los aislados VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1	109
7.2	Problemas en la secuenciación, ensamblaje y la anotación de los genomas de ECTV ...	110
7.3	Crecimiento <i>in vitro</i> de los aislados	111
7.4	Genes de ECTV candidatos a virulencia y patogénesis	112
7.4.1	Papel de los ATIs <i>in vivo</i>	115
7.5	El origen de los aislados de ECTV	118
7.6	El reservorio de ECTV en la naturaleza	120
8	Conclusiones	124
9	Bibliografía	126

1 Abreviaturas

Abreviaturas

aa	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNcd	ADN de cadena doble
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATip	Proteína de cuerpos de inclusión de tipo A
ATIs	Cuerpos de inclusión de tipo A
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina de suero bovino
BS-C-1	Línea celular de epitelio renal de mono verde africano
BTB	<i>BR-C ttk and bab</i>
CAM	Membrana corioalantoidea
CEV	Virus con envuelta doble asociada a célula
ChPVs	Chordopoxvirus
CMC	Carboximetilcelulosa
CPXV	Virus de la viruela bovina
CPXV-BR	CPXV Brighton Red
Crm	Modificadores de la respuesta de citoquinas
CTL	Linfocitos T citotóxicos
d	Días
DL ₅₀	Dosis Letal 50
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
Dpe	Días post exposición
Dpi	Días post infección
ECTV	Virus ectromelia
EEV	Viriones extracelulares con envuelta
EEVs o IMVs	Viriones maduros
EFC	Complejo de fusión y de entrada en la célula
eIF	Factor de elongación
EtOH	Etanol
FBS	Suero fetal bovino
FP	<i>Footpad</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
hpi	Horas post infección
IEV	Virus intracelular con envuelta
IFN	Interferón
IL	Interleuquina

IMV	Virus maduro intracelular
ITR	Repeticiones terminales invertidas
IV	Virus inmaduro sin envuelta
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LUCA	Ancestro celular común
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MOCV	Virus del molusco contagioso
moi	Multiplicidad de infección
MPXV	Virus monkeypox
MYXV	Virus myxoma
NCLDV	Virus grandes de ADN y desarrollo núcleo-citoplasmático
NF- κ B	Factor nuclear κ B
NGS	Secuenciación de nueva generación
NJ	<i>Neighbour joining</i>
NK	Natural killer
nt	Nucleótido
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPVs	Orthopoxvirus
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
PKR	Protein kinasa activada por ARNcd
pi	Post infección
POZ	Poxvirus and zinc finger
PRRs	Receptores del reconocimiento de patrones
RING	Really interesting new gen
Rmp	Locus de resistencia a <i>mousepox</i>
RT	Temperatura ambiente
SCF	<i>Skp, Cullin, F-box containing complex</i>
SDS	<i>Dodecilsulfato</i> sódico
SECRET	Smallpox virus-encoded chemokine receptor
SEMA	Semaforina
SOD	Superóxido dismutasa
SPI	Inhibidor de serpin proteasa
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
ufp	Unidad formadora de placa

VACV	Virus vaccinia o de la vacuna
VACV-COP	VACV Copenhagen
VACV-MVA	VACV Modified Vaccinia Virus Ankara
VACV-NYCBH	VACV New York City Board of Health
VACV-VTT	VACV Tian Tian
VACV-WR	VACV Western Reserve
VARV	Virus de la viruela
VARV-BSH	VARV Bangladesh 1975
vCKBPs	Proteínas virales de unión a quimioquinas
VCP	Proteínas virales de unión al complemento
VETF	Factor de transcripción temprana viral
VGf	Factor de crecimiento viral
VITF	Factor de iniciación de la transcripción viral
VLTF	Factor de transcripción tardío viral
YLDV	Yaba like disease virus

2 Resumen

Ectromelia virus (ECTV) is the causative agent of *mousepox*, an acute exanthematous disease of mouse colonies that occurred worldwide in the past century. Three ECTV genomic sequences are available to date: ECTV-Moscow, ECTV-Naval and erythromelalgia-related poxvirus. The comparison of the virulence and the gene repertoire of several virus strains provides a powerful tool to discover determinants of pathogenesis and to assess the evolutionary relationship within the members a species. In this thesis we compare the genome sequence of the ECTV-Naval strain by three different technologies: Sanger, Illumina and 454-Roche, and report 8 new genomes of ECTV strains derived from outbreaks in laboratory mouse colonies, strains passed extensively *in vitro* and one natural isolated from a field mouse. The phylogenetic analysis based on the highly conserved central genomic region reveals the existence of two clades sharing at least 98% identity at the nucleotide level: (1) the European clade including ECTV-Hampstead ECTV-Moscow, ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5, ECTV-MouKre, and also the Japanese strain ECTV-Ishibashi; and (2) the Asian clade, formed by ERPV, and the viruses isolated from outbreaks in the North American continent, ECTV-Naval and ECTV-Cornell. Within the European clade, there is a well-defined subclade formed by three viruses isolated from central Europe outbreaks (ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5) and the unique ECTV found in wild mice (ECTV-MouKre). Viral strains isolated from animal house outbreaks show a higher accumulation of mutations in immunomodulatory genes, as compared to genes located at the central region of the genome. However, these changes do not compromise the integrity of the genes. On the other hand, viral strains that have been extensively passed *in vitro*, such as ECTV-Hampstead Egg, ECTV-Mill Hill and ECTV-Ishibashi, have lost some immunomodulatory genes. Footpad infection of susceptible BALB/c mice shows a great variability among the isolates: the virulence of the central European subclade strains is intermediate between that of the attenuated isolates (ECTV-Hampstead Egg, ECTV-Mill Hill and ECTV-Ishibashi) and the prototypical virulent strains ECTV-Moscow and ECTV-Naval. Interestingly, unlike other members of the central European subclade, ECTV-MouKre showed no inflammation at the site of infection. The comparison of the genome sequence of these ECTV isolates and their virulence in mice identifies several candidate genes as determinants of virulence or suspected to be involved in the blockade of the inflammatory response. Only ECTV-Hampstead, and the *in vitro* passage derived ECTV-Hampstead Egg, were found to be able to occlude viral particles within A-type inclusion bodies *in vitro* and *in vivo* due to the presence of a full-length orthologue of the VACV P4c gene. Although ECTV-Hampstead and ECTV-Moscow share a nearly identical genome, only the former displays a dose-independent virulence in mice. The occlusion of ECTV-Hampstead viral particles in A-type inclusion bodies delays its dissemination within the host and hampers its transmission among mice. Finally, the genome sequence of the isolates WAU86 y WAU88-1, initially described as ECTV causing outbreaks in Poland, are highly attenuated VACV closely related to the VACV-Lister strain.

3 Introducción

3.1 La familia *Poxviridae*

Los poxvirus son virus grandes y complejos con un tamaño de 200-450 nm de largo y 140-260 nm de ancho (Figura I1). Presentan una forma ovalada o “de ladrillo” y su membrana externa muestra crestas de función desconocida. El genoma está compuesto por una molécula de ADN de cadena doble (ADNcd) y, a diferencia de otros virus grandes de ADN, su ciclo vital se desarrolla íntegramente en el citoplasma de la célula infectada (Moss, 2007).

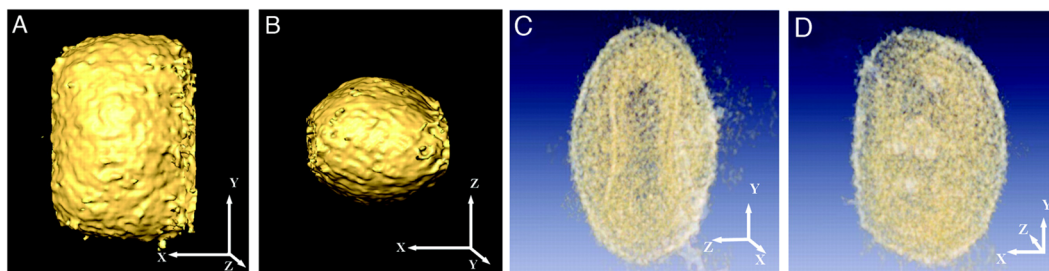


Figura. I1. Representación volumétrica de una partícula viral reconstruida por tomografía axial. Se muestra una proyección de la superficie (A y B) y una representación translúcida del virión que muestra la complejidad interna y la típica forma biconcava del nucleóide (C y D). (Figura de (Cyrklaff et al., 2005).

El nombre de la familia *Poxviridae*, proviene del vocablo inglés *pock*, que significa pústula, que agrupaba inicialmente a una serie de enfermedades o lesiones de la piel. Esta familia se divide en dos subfamilias, *Entomopoxvirinae* y *Chordopoxvirinae*, que infectan a artrópodos la primera y a vertebrados la segunda. Ambas subfamilias se dividen a su vez en géneros cuyos miembros presentan similitud genética y antigénica. Los Chordopoxvirus (ChPVs) se clasifican en 8 géneros: Avipoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus, Orthopoxvirus (OPVs), Molluscipoxvirus, Parapoxvirus, Suipoxvirus y Yatapoxvirus. El género más estudiado es el de los OPVs que incluye al virus de la viruela (VARV), único OPV estricto de humanos y agente causal de la enfermedad infecciosa más letal de la historia de la humanidad (tabla I1). Otro representante de este género es el virus de la vacuna (VACV), que es el OPVs mejor caracterizado y que fue el primer virus de animales observado al microscopio electrónico. VACV, junto con el virus de la viruela bovina (CPXV) y el virus monkeypox (MPXV), presentan un rango de hospedador muy amplio y son los únicos OPVs que causan zoonosis en humanos (tabla I1). El virus ectromelia (ECTV) es un OPV que infecta exclusivamente a ratones produciéndoles una enfermedad conocida como *mousepox*, o viruela de ratón. *Raccoonpox*, *Skunkpox* y *Volepox* son especies de OPVs endémicas de Estados Unidos (EE.UU.) que se conocen como OPVs del nuevo mundo.

Tabla I1. Rango de hospedador de algunos OPVs.

OPVs	Distribución	Reservorio natural	Huésped	Zoonosis en humano
VARV	Mundial (erradicado)	Ninguno	Humano	-
CPXV	Eurasia occidental	Roedores	Humano, vacas, gatos, zorro, animales de zoo	si
VACV	Mundial	Desconocido	Humano, ganado, búfalos, conejos	si
MPXV	África, EE.UU. ^a	Roedores, ardillas	Humano y monos	si
ECTV	Mundial ^b	Roedores	Ratón	ERPv
CMLV	África	Camélidos	Camellos	no

a: MPXV llegó a EE.UU. por la importación de ratas de Gambia. b: ECTV-Cornell se importó a EE.UU. por sueros contaminados de China. c: Solo el aislado ERPv se ha propuesto que puede infectar humanos.

Se han publicado casos de zoonosis por miembros de otros géneros como Parapoxvirus y Yatapoxvirus (tabla I1) (McFadden, 2005). Al género Molluscipoxvirus pertenece otro poxvirus obligado de humanos, el virus del molusco contagioso (MOCV). Este virus produce lesiones sin inflamación en la piel de niños inmunocompetentes e infecciones oportunistas más graves en individuos inmunodeficientes (Moss, 2007).

3.2 El origen de los poxvirus

El origen de los virus es actualmente objeto de intenso debate. Se han propuesto tres hipótesis: La primera (*first-virus hypothesis*) contempla que los virus sean reliquias de una forma de vida pre-celular, la segunda (*reduction hypothesis*) propone que los virus han evolucionado desde un organismo unicelular reduciendo su contenido genético hasta subsistir solo de forma parasitaria y la tercera (*escape hypothesis*) sugiere que los virus se han originado desde material genético que se separó de la célula y evolucionó hasta convertirse en un parásito estricto (Forterre, 2006; Iyer et al., 2006). Esta última se basa en la observación de que muchos virus, como los poxvirus, presentan genes con alta similitud con genes eucariotas. Resulta difícil imaginar que virus con un genoma grande de ADN como los poxvirus, pudieran tener un ancestro común con virus pequeños como los poliomavirus, o picornavirus, que tienen genomas pequeños de ADN o ARN respectivamente. Un origen polifilético para estos virus tan diferentes podrían justificar la validez de más de una de las hipótesis anteriormente expuestas.

La familia *Poxviridae* junto con las familias *Asfviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae* y *Mimiviridae* constituyen el grupo de virus grandes de ADN y desarrollo nucleo-citoplasmático (NCLDV). Recientemente y basándose en la observación de que varias proteínas virales no presentan similitud con proteínas de organismos celulares, se ha propuesto que los NCLDV podrían tener un origen anterior al ancestro celular común (LUCA). Estudios filogenéticos basados en algunas proteínas relacionadas con organismos celulares apuntan a la hipótesis del escape (Forterre, 2006; Iyer et al., 2006). Por último, la teoría de eucariogénesis viral, propone que virus como los poxvirus o los mimivirus podrían ser el origen evolutivo del núcleo eucariótico al ser los únicos NCLDV con desarrollo exclusivamente citoplasmático que presentan una maquinaria de replicación similar a la celular (Bell, 2001; Takemura, 2001)

3.3 Evolución de los OPVs

La tasa de mutación por replicación de genoma es mucho más alta en los virus de ARN que en los de ADN (Hughes et al., 2010). La velocidad de evolución de los poxvirus se ha podido estudiar comparando las mutaciones acumuladas entre distintos aislados. Así, comparando las secuencias de 132 genes de VARV se ha estimado una tasa de 5×10^{-6} mutaciones de nt por año (Hughes et al., 2010). Aplicando estos datos de VARV al análisis de la secuencia del gen de la ADN polimerasa de los ChPVs, se ha calculado que los OPVs se originaron hace 0,3 millones de años y que el último ancestro común entre los poxvirus de invertebrados y los ChPVs existió hace 0,5 millones de años (Babkin and Babkina, 2012; Babkin and Shchelkunov, 2006)

Dentro de los ChPVs, la opinión común es que los OPVs se han originado desde un ancestro similar a CPXV por una progresiva pérdida y modificación de la información genética (Babkin and Babkina, 2012; McLysaght et al., 2003). Se ha llegado a proponer un nuevo orden taxonómico en el cual todos los aislados de OPVs, con la excepción de ECTV y de las especies del nuevo mundo, estarían agrupados en

linajes de CPXV (Carroll et al., 2011). De hecho se piensa que la primera división entre los OPVs ocurrió hace 14.000 años cuando los aislados CPXV-Brighton Red (CPXV-BR) y ECTV divergieron, diferenciándose del grupo de OPVs que incluye a CPXV-GRI-90, MPXV, VARV y el virus *camelpox* (CMLV) (Figura 12).

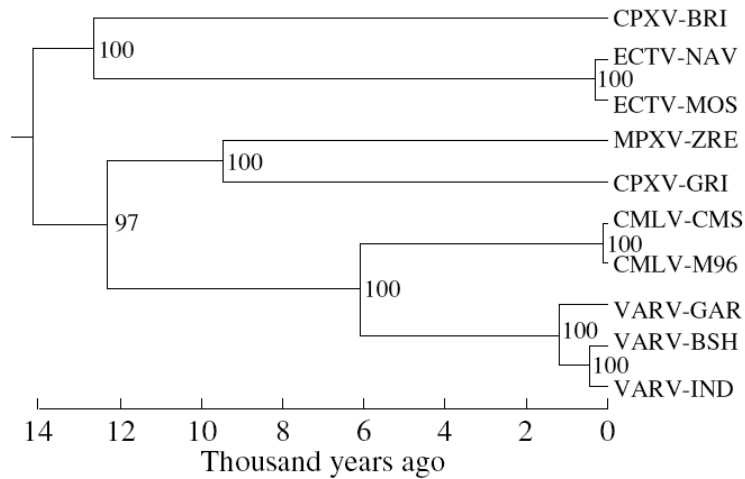


Figura 12. Reconstrucción de la evolución de los OPVs. (Figura de Babkin and Shchelkunov, 2006)

VARV y CMLV divergieron, a su vez, hace 6.000 años, mientras que VARV y Taterapox lo hicieron hace 3.000-4.000 años. Un estudio filogenético de los OPVs propone que VARV y CMLV forman un subgrupo; CPXV se divide en varias sub-especies agrupándose CPXV-GRI-90 cerca de VACV, y CPXV-BR más cerca de ECTV y MPXV que también forman grupos independientes (Carroll et al., 2011). A nivel de especie, la separación de los dos clados de VARV habría ocurrido hace 700-1.300 años, coincidiendo con las primeras evidencias históricas y arqueológicas de la aparición de la viruela (Babkin and Babkina, 2012; Hughes et al., 2010; Li et al., 2007). A nivel de especie, un estudio comparativo de los genomas de 47 aislados de VARV con diferentes orígenes geográficos y años de aislamiento, ha proporcionado datos sobre el origen de VARV y los eventos claves de su propagación desde África hacia el resto del mundo (Li et al., 2007). Por otro lado, un análisis filogenético de los genomas de 12 aislados de CPXV indica que, al contrario de lo que se había pensado anteriormente, las cepas silvestres y las cepas vacunales modernas de VACV están más relacionadas con los aislados de CPXV del continente europeo que con los del Reino Unido, donde se inició la vacunación (Carroll et al., 2011). Todos estos estudios coinciden en presentar al grupo de ECTV como el más alejado filogenéticamente del resto de OPVs, posiblemente debido a su escisión evolutiva temprana de los grupos de CPXV en la historia de este género (Carroll et al., 2011; Chen et al., 2003).

La presencia de homólogos de genes celulares en el genoma de los poxvirus refleja un mecanismo molecular de adaptación de estos virus a su hospedador, logrado durante un largo proceso de co-evolución. Estas adquisiciones han ocurrido por múltiples eventos de recombinación genómica, que suponen una vía de adquisición de variabilidad genética más rápida que la acumulación de mutaciones puntuales (Hughes et al., 2010). La recombinación entre el genoma de un poxvirus que se replica en el citoplasma y el ADN celular en el núcleo es difícil de explicar. Sin embargo, se ha propuesto que durante la prolongada co-evolución virus-hospedador, un ARN mensajero (ARNm) celular se podría haber

retrotranscrito accidentalmente durante una co-infección con un retrovirus, permitiendo al poxvirus incorporar ADN complementario retrotranscrito. Estos eventos de transferencia horizontal, desde el hospedador a los poxvirus, no fueron ni frecuentes ni recientes en la historia genética de esta familia como se demuestra en análisis filogenéticos de familias de genes de vertebrados y sus homólogos codificados por los poxvirus, como por ejemplo la glutaredoxina o la interleuquina-10 (IL-10) (Bratke and McLysaght, 2008; Hughes, 2002; Hughes and Friedman, 2005; Odom et al., 2009). Una alternativa no descartada, es que estos genes virales hayan estado presentes desde el origen de los poxvirus y de los NCLDV's en general (Forterre, 2006).

3.4 VARV, CPXV y MPXV

VARV es el agente causal de la viruela, enfermedad altamente contagiosa con una tasa de mortalidad de hasta un 30% (Constantin et al., 2003). El primer caso documentado de viruela fue el faraón Ramses V que probablemente murió a causa de esta enfermedad en el año 1145 a.c. (Figura I3, panel A). En el siglo IV, como profilaxis en la India y China se practicaba la variolación que consiste en la inoculación con el propio VARV desde pus o costras de individuos afectados. En Europa, la enfermedad se estableció en el siglo XVI, favorecida por el aumento demográfico y los intercambios entre países. Con el descubrimiento de las Américas, VARV fue importado a América del Sur y se estima que, junto con las guerras, podría haber sido una de las causas de la rápida disminución de la población indígena (Shchelkunov, 2009). En el siglo XVIII, VARV era endémico en todo el mundo menos en Australia. La variolación fue introducida en Europa en 1715 por Lady Mary Wortley Montagu (Downie, 1951). En el 1796, Edward Jenner empezó la práctica de la vacunación basándose en la observación de que las ordeñadoras de vacas presentaban pústulas parecidas a la viruela, pero eran inmunes frente a ésta. Su vacuna consistía en la inoculación en humanos del contenido extraído a partir de las pústulas de las vacas enfermas (Downie, 1951). La Organización Mundial de la Salud (OMS) empezó en el año 1959 la campaña de erradicación de la viruela empleando diferentes cepas de VACV. Rahima Banu, una niña de Bangladesh, fue la última persona infectada con la variante letal VARV mayor, en 1975 (Figura I3, panel B). Sin embargo, VARV persistía aún en el Cuerno de África en su variante menos virulenta, *alastrim* minor (Fenner, 1993). El 27 Octubre de 1977, se describió en Somalia el último caso de infección natural de viruela. Sin embargo, la última muerte se registró en el 1978 en Inglaterra por manipulación del virus en un laboratorio. Desde entonces, el peligro de una posible liberación de VARV de los laboratorios y la reintroducción en la población humana, llevó a la destrucción de todos los viales de VARV existentes en el mundo y a la conservación de unos pocos en laboratorios de alta seguridad de EE.UU. (CDC, Atlanta) y Rusia (VECTOR, Kotsovo) bajo estricto control internacional. La OMS ha planeado destruir estos stocks de VARV, pero la posibilidad de que VARV pueda ser utilizado como arma biológica por terroristas ha retrasado su destrucción hasta que se mejoren las vacunas y se desarrollen al menos dos compuestos anti-virales, un objetivo que esta cerca de cumplirse (Fenner, 1993; Henderson, 2011; Mahy et al., 1993).

MPXV es el agente causal de *monkeypox*, una enfermedad que se describió en monos de zoológicos en 1957 en Dinamarca y se propagó a otros zoológicos de Europa y América (Arita et al., 1972). El reservorio natural de MPXV son las ardillas y otros roedores (rata de Gambia) de las selvas tropicales de África (Khodakevich et al., 1986). Actualmente, MPXV está remplazando el nicho ecológico

dejado por VARV en África, causando una zoonosis en humanos muy parecida a la viruela (Figura I3, panel C) (Hutin et al., 2001; Rimoin et al., 2010). En países donde el SIDA es endémico, como la República Democrática del Congo, su tasa de mortalidad entre 2001-2004 llegó a ser del 78% (Rimoin et al., 2007). Desde los primeros casos que se detectaron en los años 70 en Zaire (Jezek et al., 1986) hasta la fecha, la incidencia de *monkeypox* ha subido del 2 al 20%, principalmente entre menores de 15 años (Rimoin et al., 2010). En el 2003 en EE.UU. hubo un brote de *monkeypox*, con 37 personas hospitalizadas, debido a la introducción de roedores infectados con MPXV importados de Gambia (Reed et al., 2004). Después de la erradicación de VARV, *monkeypox* es hoy la enfermedad más importante causada por un poxvirus en humanos. El brote en EE.UU. ha demostrado además que no es una enfermedad confinada solo a ciertas partes de África y que tiene facilidad para propagarse en humanos, especialmente cuando una alta proporción de la población humana no ha sido vacunada contra la viruela, que confiere protección contra OPV y virus relacionados como MPXV.

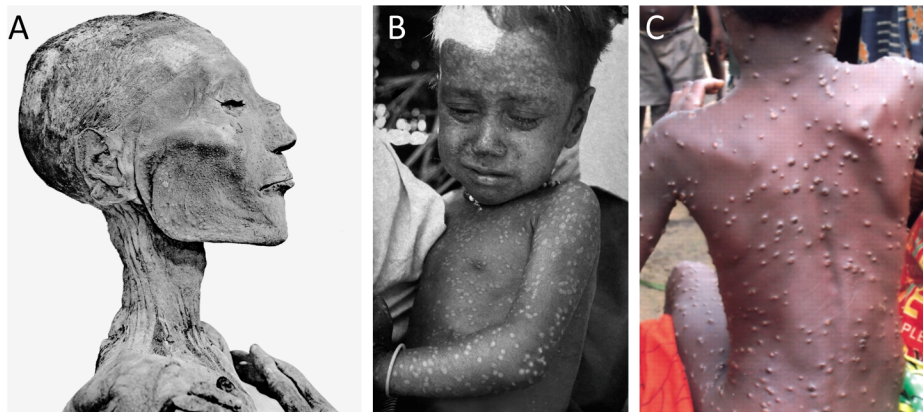


Figura I3. Infecciones de poxvirus en humano. (A) La momia del faraón Ramses V fue el primer caso descrito de viruela en la historia de la humanidad. (B) Rahima Banu fue la última persona en el mundo que contrajo la variante más letal de VARV y que sobrevivió a esta infección. (C) MPXV causa una zoonosis en humanos muy parecida a la viruela.

CPXV es el virus que Jenner utilizó para la vacunación y hasta hace 40 años todavía se transmitía desde las vacas a las manos de los ordeñadores (Baxby, 1977; Downie, 1951). CPXV circula en Eurasia occidental y presenta un amplio rango de hospedador (tabla I1) infectando animales tan distintos como vacas, gatos domésticos, elefantes y otros animales de zoológico (Baxby and Ghaboosi, 1977; Begon et al., 1999). En países como Inglaterra, Francia, Alemania, Noruega y Finlandia, donde existe un reservorio de CPXV establecido en roedores es muy frecuente la zoonosis en humanos (Baxby, 1977; Bennett et al., 1997; Crouch et al., 1995; Favier et al., 2011; Hansen et al., 2009; Hemmer et al., 2010; Okeke et al., 2012). Estos casos han ocurrido principalmente en cuidadores de animales de zoológicos y dueños de gatos domésticos. Mientras que para los primeros el contacto es directo, para los segundos el virus ha sido capaz de efectuar dos saltos de especie, facilitados por el hecho de que el gato es depredador natural del ratón y a la vez mascota común del hombre. Sin embargo, la transmisión gato-gato es muy rara. Uno de los casos más recientes de zoonosis es alarmante ya que se trataba de un joven noruego infectado por un CPXV que había recombinado de forma natural con un ECTV (Okeke et al., 2012).

La alta densidad demográfica actual y la gran facilidad para viajar, unido a la fuerte reducción en el número de individuos vacunados contra VARV, están incrementando el número de casos de zoonosis de CPXV en humanos. Además, la posibilidad de que OPVs diferentes recombinen entre sí, abre la puerta a la aparición de nuevos OPVs adaptados al ser humano, que no tendrían impedimento para expandirse fácilmente y crear una nueva epidemia.

3.5 VACV y la vacunación

En el siglo XVIII Jenner descubrió que a través de CPXV se podía instaurar inmunidad frente a VARV. Desde entonces, se estableció la vacunación con CPXV en lugar de la práctica de la variolación y poco a poco VACV reemplazó a CPXV como agente vacunal (Paran and Sutter, 2009); Jacobs et al., 2009). En 1939 Downie descubrió que el virus que se estaba utilizando como vacuna durante todo el siglo XX no era el mismo que había utilizado Jenner y le llamó “virus de la vacuna” en referencia a la vacunación. Desde entonces, VACV ha sido el virus prototipo utilizado en investigación básica para entender la biología y la patogénesis de los OPVs y para el desarrollo de las vacunas de la campaña de erradicación de la viruela. El origen y el hospedador natural de VACV se desconocen. Se ha aislado en búfalos (Dumbell and Richardson, 1993) y caballos, y se ha sugerido que puede estar relacionado con *horsepox*, un poxvirus que causaba lesiones en caballos (Alcamí and Smith, 1996; Tulman et al., 2006). Recientemente se han descrito numerosos casos de zoonosis en humano en Río de Janeiro y Sao Paulo causadas por un virus parecido a VACV, que circula en vacas de leche y roedores, y que se ha encontrado también en monos de la selva Amazónica de Brasil (da Fonseca et al., 2002; Nagasse-Sugahara et al., 2004; Schatzmayr et al., 2009).

Las vacunas de tipo Jenneriano basadas en aislados de VACV son las que se denominan vacunas de primera generación. Existen muchos aislados distintos que se usaron durante la campaña de erradicación de la viruela de la OMS. Diferentes países producían las cepas vacunales que se obtenían generalmente inoculando el virus en la piel de búfalos, conejos, ovejas y vacas (Paran and Sutter, 2009); Jacobs et al., 2009). VACV-NYCBH (*New York City Board of Health*) se utilizaba en América y África oriental, y un derivado de éste, VACV-EM-63, en Rusia e India (Paran and Sutter, 2009); Jacobs et al., 2009). VACV-Lister y VACV-Lister/Elstree se desarrollaron en el *Lister Institute* en Inglaterra y fueron los más utilizados entre 1968-1971 en todo el mundo (Rosenthal et al., 2001). También se emplearon los aislados VACV-Copenhague (VACV-Cop) en Dinamarca, VACV-Ankara en Turquía y VACV-VTT (*Vaccinia Tian Tian*) en China (Paran and Sutter, 2009); Jacobs et al., 2009). La vacunación con los aislados utilizados durante la campaña de erradicación de la viruela presentaban, con frecuencia, complicaciones adversas, como miocarditis, encefalitis, complicaciones oculares o infecciones generalizadas (Paran and Sutter, 2009); Jacobs et al., 2009). Después del programa de erradicación y hasta el 2007, la vacuna Dryvax® se producía en la piel de vacas infectadas con VACV-NYCBH y se utilizaba principalmente en EE.UU. (Jacobs et al., 2009; Rosenthal et al., 2001). Durante los estudios de producción de aislados atenuados de VACV se produjo VACV-WR (*Western Reserve*), el VACV más estudiado junto con VACV-Cop. VACV-WR se obtuvo por pases intracraneales de VACV-NYCBH en ratón y es altamente neurovirulento (Parker et al., 1941). El aislado VACV-Lister es un virus mucho más atenuado que VACV-WR por vía intranasal (IN) y sólo resulta letal si se inocula intracranealmente (Abdallrhman et al., 2006).

Las vacunas de segunda generación derivan de las cepas vacunales de tipo Jenneriano, pero a diferencia de estas, se han crecido en cultivos celulares y no se han atenuado más que las clásicas. Un ejemplo es ACAM 2000 que se creció en cultivos de células Vero y se purificó de placas de lisis, comercializándose como vacuna en EE.UU desde el año 2007 (Paran and Sutter, 2009); Jacobs et al., 2009).

Las vacunas de tercera generación se basaron en la atenuación de VACV por numerosos pases en cultivo o membranas crioalantoideas (CAMs) de huevo. Los candidatos vacunales más conocidos son VACV-*Lister clone 16m8* (LC1m8) y VACV-*Modified Vaccinia Virus Ankara* (MVA). VACV-LC16m8 se desarrolló en Japón en el año 1975 tras 36 pases de VACV-Lister en células epiteliales primarias de riñón de conejo a baja temperatura (Kenner et al., 2006). Las vacuna VACV-MVA se obtuvo tras 570 pases en CAM de un derivado del aislado VACV-Ankara. Estos virus no presentan los efectos secundarios indeseados de las vacunas de primera y segunda generación (Gilbert, 2013).

Los avances biotecnológicos permitieron la producción de las vacunas de cuarta generación como NYVAC o VACV Δ E3L, que se han obtenido mediante la delección o interrupción de genes inmunomoduladores, de virulencia, determinantes el rango de hospedador o hasta incluso genes esenciales para la replicación del virus (Paran and Sutter, 2009); Jacobs et al., 2009).

Más recientemente, las estirpes vacunales de VACV se están utilizando para la expresión de proteínas recombinantes de patógenos que producen otras enfermedades como la rabia (Cliquet et al., 2008), el SIDA (Esteban, 2009; Hanke et al., 2002) y la tuberculosis (Hawkrigde et al., 2008).

3.6 El genoma de los poxvirus

El genoma de los poxvirus es una molécula de ADNdc lineal que varía entre 130 y 300 kbp. El genoma de VARV, con aproximadamente 185 kbp, es el más pequeño de entre los OPVs, mientras que el más grande es el de CPXV con aproximadamente 225 kbp. Los genomas de los OPVs se caracterizan por presentar un contenido de A+T cercano al 65%. Se dispone de la secuencia completa del genoma de 92 OPVs, 49 de los cuales pertenecen a la especie VARV. La organización genómica está altamente conservada entre todos los miembros de la familia (Lefkowitz et al., 2006). Los genes están muy empaquetados con bajo grado de solapamiento y organizados en tres regiones: una terminal repetida invertida (ITR) de unas 10 kbp a ambos extremos del genoma, una región de genes variables a continuación de unos 30-60 kbp y una región central conservada (Figura I4).

Las ITRs en ambos extremos del genoma son secuencias repetidas idénticas y con orientación opuesta (Baroudy et al., 1982); albergan unos pocos genes; dos zonas de cortas repeticiones repetidas, DRI y DRII, que en VACV son bloques de 13 y 17 copias de 70 bp, respectivamente (Witteck, 1982); una secuencia de menos de 100 bp rica en A+T, necesaria para la resolución de los concatámeros que se forman durante la replicación del genoma; y una estructura de horquilla que mantiene unidas covalentemente las dos hebras de ADN (Figura I4).

Las regiones variables de unos 30 kbp codifican para aproximadamente 40 genes en cada lado del genoma, son hipervariables y pueden presentar extensas delecciones o reorganizaciones genómicas simétricas (Witteck, 1982).

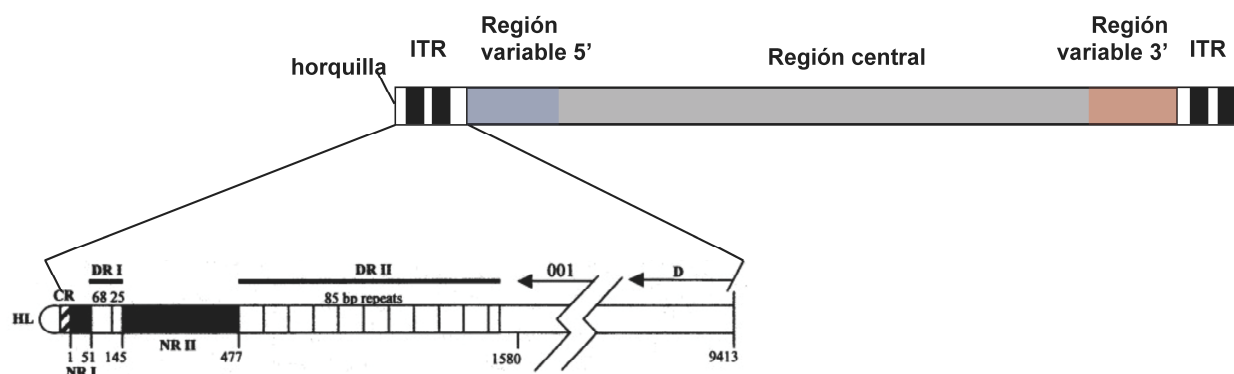


Figura I4. Representación esquemática del genoma de un ECTV-Moscow. En gris se indica la región conservada, en azul y en rojo las regiones variables 5' y 3', respectivamente. Aumentado se muestra uno de los ITR con la horquilla (HL), la secuencia de resolución del concatámero (CR), las regiones no repetidas NRI y NRII y las regiones repetidas DRI y DRII. (Modificado de (Mendez-Rios et al., 2012).

Esta variabilidad se observa incluso entre especies del mismo género, afectando a genes implicados en la interacción virus-hospedador como genes inmunomoduladores, determinantes del rango de hospedador y virulencia.

La región central está altamente conservada y codifica para aproximadamente 120 genes esenciales para la replicación y la morfogénesis del virus. La mayoría de estos genes se clasificaron como genes conservados del *core*. Dentro de la subfamilia de los ChPVs se han encontrado 90 genes conservados, de los cuales 49 se conservan también entre los poxvirus de vertebrados y de insectos (Lefkowitz et al., 2006; Upton et al., 2003).

3.7 Ciclo viral de los poxvirus

Los poxvirus y los mimivirus (Mutsafi et al., 2010) son los únicos entre todas las familias virales en llevar a cabo su ciclo viral completo, desde la replicación hasta el ensamblaje, en el citoplasma de la célula infectada (Figura I5) (Moss, 2007). Se piensa que los viriones maduros de VACV se unen a la célula por interacción de sus proteínas H3, A27 y D8 con glicosaminoglicanos (GAGs) (Carter et al., 2005; Chung et al., 1998; Hsiao et al., 1999) o de la proteína A26 con la proteína laminina de la superficie celular (Figura I5, paso 1) (Chiu et al., 2007). Una vez adherido a la célula, la entrada del virión puede ocurrir a pH neutro por fusión directa con la membrana celular o a pH ácido, siguiendo la ruta endosomal, en un proceso mediado por el complejo de fusión A17-A27 (Kochan et al., 2008; Townsley et al., 2006). En total, se han descrito 14 proteínas que forman o se asocian con el complejo de fusión de membrana y entrada en la célula (EFC) (Moss, 2012; Satheshkumar and Moss, 2009). Una vez dentro de la células, el nucleoide es liberado y transportado mediante microtúbulos a la región perinuclear (Figura I5, paso 2) donde empieza la transcripción de los genes tempranos que codifican para proteínas implicadas en replicación, modificación de las rutas intracelulares y la respuesta inmune (Figura I5, paso 3). La replicación, asistida por factores nucleares (Oh and Broyles, 2005), empieza 1-2 horas post infección (hpi) produciendo unas 10^4 copias de genomas por célula infectada. Una parte de estas nuevas moléculas de ADN pueden ser moldes para la transcripción de los genes intermedios y otra parte se empaqueta en los viriones que se están formando. La mayoría de los genes intermedios codifican para proteínas de nucleoide y de empaquetamiento del genoma, pero también para factores de transcripción

tardía que permiten la transcripción de los genes tardíos. Estos genes codifican por las proteínas estructurales y enzimas implicadas en la morfogénesis del virión y también para las proteínas implicadas en la entrada del virus en la célula.

La morfogénesis ocurre en regiones conocidas como factorías virales o cuerpos de inclusión de tipo B (Figura I5, paso 4). Se pueden distinguir hasta 4 formas de virus dentro de la célula infectada: virus inmaduro sin envuelta (IV), virus maduro intracelular (IMV), virus intracelular con envuelta (IEV) (Figura I5, paso 5) y virus con envuelta doble asociada a célula (CEV) (Figura I5, paso 5). Estos últimos se pueden disociar de la célula dando lugar a viriones extracelulares con envuelta (EEV) (Figura I5, paso 7) (Roberts and Smith, 2008). Los IMV, CEV y EEV son las formas infecciosas del virus, los EEV constituyen aproximadamente el 1% de la progenie viral mientras que los IMV más del 90% (McKelvey et al., 2002; Smith and Vanderplasschen, 1998). Los IMV son transportados al *trans*-Golgi (Schmelz et al.,

1994) donde adquieren una membrana adicional convirtiéndose en IEV que viajan a la periferia de la célula asociados a microtúbulos y se fusionan con su membrana dando lugar a los CEV. La disociación de estos microtúbulos por fosforilación de la proteína A36 (Newsome et al., 2004) (Figura I5, 16) estimula la formación de filamentos de actina debajo de los CEV, generando una cola de actina polimerizada que propulsa el movimiento de los viriones en la superficie celular y facilita la infección de células cercanas. Recientemente, se ha descrito un mecanismo de repulsión por el cual se inhibe la entrada de los nuevos viriones en la célula ya infectada (Doceul et al., 2010). Esto ocurre por la formación de colas de actina que permiten a los EEV proyectarse lejos de las células infectadas donde se han producido y alcanzar células más lejanas (Blasco and Moss, 1992; Doceul et al., 2010).

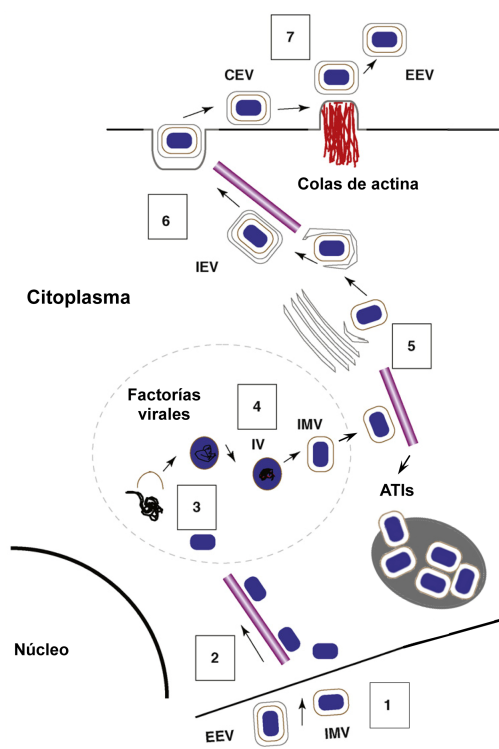


Figura I5. Ciclo de replicación de VACV.
(Modificado de (Harrison et al., 2004).

3.7.1 Los cuerpos de inclusión de tipo A (ATIs)

Los ATIs son regiones citoplasmáticas electrodensas al microscopio electrónico (Figura I6) (McKelvey et al., 2002). Están formados por la proteína ATIp, una proteína de 160 kDa en CPXV que contiene repeticiones hidrofóbicas esenciales en su región C-terminal (Funahashi et al., 1988; Howard et al., 2010). VACV, VARV, MPXV, CLMV y algunos aislados de CPXV presentan una proteína ATIp truncada y no son capaces de formar ATIs (Amegadzie et al., 1992b) (Meyer and Rziha, 1993). Este fenotipo se denomina V^0 . Existen dos fenotipos de ATIs, los que presentan partículas virales incluidas (V^+) y los que no (V^-) (Ichihashi and Matsumoto, 1966; Shida et al., 1977). Los IMV de entomopox, fowlpox, racoonpox,

canarypox y algunos aislados de ECTV y CPXV, se incluyen en los ATIs (V^+) que aparecen en las fases tardías de la infección en la mayoría de los órganos y tejidos, a excepción del hígado (Ichihashi and Matsumoto, 1966; (Marchal, 1930; Randall et al., 1964). Se ha descrito un tercer fenotipo de ATIs $V^{+/-}$, que presentan IMV exclusivamente en el perímetro del cuerpo de inclusión como resultado de la recombinación ocurrida entre un virus V^+ con un virus V^0 (Okeke et al., 2009).

Dos proteínas de la membrana de los IMV median su inclusión en la matriz proteica formada por ATIp. Estas proteínas en VACV-Cop se conocen como A26 o P4c y A27 (Howard et al., 2010; McKelvey et al., 2002; Ulaeto et al., 1996). La proteína A27 es una proteína que forma trímeros y se ancla a la membrana de los IMV interaccionando con la proteína integral de membrana A17 (Vázquez and Esteban, 1999; Vázquez et al., 1998). El gen A26L codifica para la segunda proteína de membrana de los IMV que controla su inclusión en los ATIs. A26 o P4c, está presente en la membrana de los IMV y no es esencial para la formación de IEV (McKelvey et al., 2002). P4c no presenta región transmembrana ni regiones hidrofóbicas e interacciona mediante su región N-terminal con ATIp y mediante su región C-terminal con el complejo A27-A17 (Howard et al., 2010). A26 sirve por tanto de puente entre A27 en la membrana de los IMVs y la proteína ATIp de los ATIs permitiendo la inclusión de los viriones en los ATIs (Howard et al., 2008).

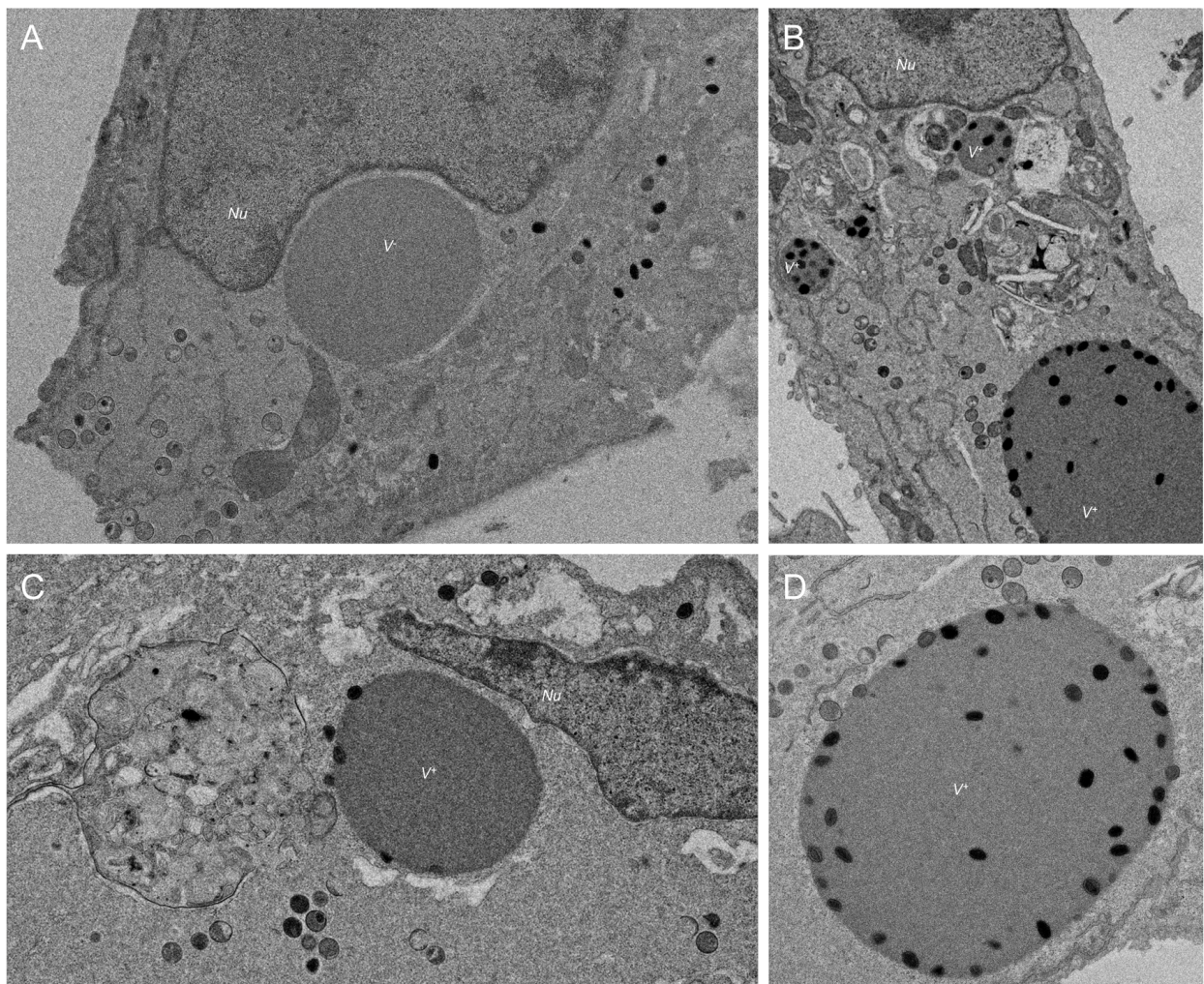


Figura 16. Fenotipos de ATIs en ECTV. En A se observa una célula infectada con la presencia de un ATI con fenotipo V^- . En B, C y D células infectados con ATIs V^+ . Nu: núcleo.

La función de los ATIs no está clara ya que el secuestro de los IMV en los ATIs limita la progenie viral extracelular. Esta retención parece ser contraproducente, ya que en las fases tempranas de la infección *in vivo* los EEV son las partículas más eficaces para diseminarse en el hospedador (Blasco and Moss, 1992; Smith and Vanderplasschen, 1998). Sin embargo, los IMV son partículas virales robustas y por lo tanto más indicadas para la transmisión del virus entre un hospedador y otro. Por este motivo se ha propuesto que la función de los ATIs sea la de proteger a los IMV de la posible degradación ambiental durante la transmisión del virus entre hospedadores (Howard et al., 2010; McKelvey et al., 2002; Okeke et al., 2009; Ulaeto et al., 1996). Las formas truncadas de ATIp siguen siendo proteínas altamente inmunogénicas ya que conservan la región inmunodominante y cross-reaccionan con antisueros hechos contra la proteína completa (Patel et al., 1986; Ulaeto et al., 1996). El gran tamaño de los ATIs hace pensar que la diana principal en el hospedador pudiera ser una célula fagocitaria como los macrófagos, que no solo son capaces de fagocitar los ATIs sino también de degradar su matriz proteica liberando los IMV. Posteriormente, la capacidad fusogénica a pH bajos de A27 permitiría a los IMV escapar a la degradación endocítica y diseminarse en el hospedador (Ulaeto et al., 1996).

3.8 Determinantes de virulencia y tropismo de los poxvirus

La presión selectiva ejercida durante la co-evolución de los poxvirus y sus hospedadores ha dado lugar, por un lado, a un sistema inmunitario complejo y, por el otro, a una amplia batería de proteínas codificadas en el genoma de los poxvirus, destinadas a sabotear la maquinaria de defensa del hospedador a todos los niveles. El estudio de la evasión del sistema inmune de los virus no solo ha proporcionado nueva información sobre los procesos inmunológicos del mismo hospedador, sino también candidatos terapéuticos virales para ser usados como anti-inflamatorios en enfermedades inflamatorias de tipo crónico o agudo (Alcami and Koszinowski, 2000; Fallon and Alcamí, 2006).

3.8.1 Modulación de la respuesta inmune por poxvirus

La respuesta inmune innata es activada por receptores del reconocimiento de patrones (PRRs) de los patógenos que están muy conservados. Estos receptores incluyen a los *toll-like receptors* (TLRs), que inician una cascada de señales que resulta en la activación de factores como NF- κ B, entre otros, que regulan la producción de citoquinas.

Las citoquinas son importantes mediadores del sistema inmune y juegan un papel crítico en el establecimiento de un estado anti-viral. Los poxvirus expresan proteínas que bloquean los efectos de las citoquinas interaccionando con estas a nivel extracelular, evitando su unión a los receptores celulares, o intracelular, bloqueando su señalización (Alcamí, 2003). Por ejemplo, los poxvirus inhiben la acción de IL-1 y IL-18 codificando las proteínas secretadas vIL-1R y IL-18BP, respectivamente, que interaccionan en el medio extracelular bloqueando su acción (Alcamí and Smith, 1992; Smith et al., 2000; Xiang and Moss, 1999). Simultáneamente, los poxvirus codifican por el inhibidor de caspasa 1 CrmA/SPI-2 que a nivel intracelular bloquea la maduración de IL-1 y IL-18. Tanto en VACV como en ECTV la ausencia del gen que codifica para IL-18BP reduce la virulencia de estos virus (Born et al., 2000; Symons et al., 2002).

3.8.1.1 Inhibición del IFN

Los poxvirus expresan factores solubles que unen y bloquean IFN de manera extracelular impidiendo la interacción con sus receptores celulares. B18 de VACV es una proteína secretada conocida como $vIFN-\alpha/\beta$ -R que interacciona con IFN de tipo I ($IFN\alpha$, $IFN\beta$), impidiendo su unión al receptor celular, y que además es capaz de unirse, mediante GAGs, a la superficie de las células cercanas a las células infectadas e impedir la amplificación de la señalización del IFN (Colamonici et al., 1995; Montanuy et al., 2011; Symons et al., 1995). Este gene se encuentra muy conservado en el genoma de todos los OPVs. La que más diferencias presenta con sus ortólogos es la codificada en el genoma de ECTV con una identidad cercana al 90%. El $vIFN-\alpha/\beta$ -R de *yaba like disease virus* (YLDV) es capaz también de unir IFN de tipo III (Huang et al., 2007). Muchos poxvirus codifican también para una proteína secretada de unión a IFN de tipo II ($IFN\gamma$) (Upton et al., 1992), denominada $vIFN\gamma$ -R. Esta proteína en VACV se conoce como B8 y es capaz de inhibir el $IFN\gamma$ de especies distintas (Alcamí and Smith, 1995), mientras que en MYXV se conoce como M-T7 y sólo inhibe $IFN\gamma$ de conejo (Mossman et al., 1995).

El principal mecanismo intracelular anti-IFN de los poxvirus es la inhibición de la protein kinasa activada por ARNcd (PKR), que se producen abundantemente durante la infección viral. La proteína E3 de VACV es el inhibidor prototípico de PKR y está conservados en muchos poxvirus (Beattie et al., 1995). Esta proteína previene la respuesta de IFN uniéndose directamente a PKR y también secuestrando el ARNcd que se produce durante una infección viral (Perdiguero and Esteban, 2009). VACV K3 es un homólogo del factor de iniciación de la traducción ($eIF-2\alpha$) que actúa como sustrato alternativo previniendo la fosforilación de $eIF-2\alpha$ mediada por la PKR (Beattie et al., 1991). CPXV, VARV y el virus *myxoma* (MYXV) expresan ortólogos de ambas proteínas mientras que ECTV, pese a ser un virus muy virulento, solo codifica para E3 (Myskiw et al., 2011; Seet et al., 2003). La fosfatasa VH1, que se encuentra dentro del virión, también constituye un importante inhibidor de la señalización inducida por $IFN\gamma$ (Najarro et al., 2001).

3.8.1.2 Inhibición del factor de necrosis tumoral (TNF)

El TNF es otra de las citoquinas pro-inflamatorias esenciales en la respuesta frente a virus. Para evadir la respuesta de TNF, los poxvirus codifican en sus genomas homólogos solubles de los receptores celulares de TNF (TNFR), conocidos como $vTNFR$ s, que secuestran TNF antes de que pueda unirse a su receptor en la superficie celular (Alejo et al., 2011). Los $vTNFR$ s mejor estudiados son la proteína T2 codificada por el genoma de los Leporipoxvirus y los modificadores de la respuesta de citoquinas (Crm) codificados por el genoma de los OPVs (Hu et al., 1994; Loparev et al., 1998; Saraiva and Alcamí, 2001; Smith et al., 1996; Xu et al., 2000). Las proteínas Crm, además de interactuar con TNF a través de su extremo N terminal, son capaces de unir quimioquinas a través del dominio llamado SECRET (*smallpox virus-encoded chemokine receptor*) en su región C-terminal (Alejo et al., 2006). Este dominio es único ya que no presenta homología con ninguna proteína conocida de vertebrados y la estructura tridimensional de uno de sus miembros ha revelado que su plegamiento es muy similar a las proteínas 35K y A41, que también unen quimioquinas (Carfi et al., 1999; Xue et al., 2011). M-T2 es un determinante de la patogénesis de MYXV (Xu et al., 2000). CPXV codifica para 4 $vTNFR$ s, llamados CrmB (Hu et al., 1994), CrmC (Smith et al., 1996), CrmD (Loparev et al., 1998), y CrmE (Saraiva and

Alcamí, 2001). Un quinto miembro de esta familia se conoce como vCD30, porque está muy relacionado a CD30 celular y une la diana celular CD153 (Panus et al., 2002; Saraiva et al., 2002). CPXV expresa todos los vTNFRs, ECTV expresa sólo CrmD (EVM003), VARV y CMLV codifican sólo CrmB mientras que VACV no conserva ninguno (Alcami and Koszinowski, 2000).

3.8.1.3 Inhibición de quimioquinas

Las quimioquinas son una familia de pequeñas citoquinas con función quimioatrayente, capaces de unirse a la superficie celular a través de GAGs y estableciendo gradientes quimiotácticos que regulan el tráfico de las células del sistema inmune (Baggiolini, 1998). Los poxvirus expresan proteínas virales de unión a quimioquinas (vCKBPs) que se secretan al medio y secuestran las quimioquinas impidiéndoles señalizar a través de sus receptores celulares (Lalani and McFadden, 1997). La proteína M-T7 de MYXV es un vIFN γ -R que, a diferencia de su ortólogo de VACV, se une a las quimioquinas en su dominio de interacción con los GAGs impidiendo la formación de un gradiente quimiotáctico (Lalani et al., 1997). Leporipoxvirus y los OPVs codifican para otra vCKBP de 35 kDa, llamada T1 en el primero y conocida como 35K en el segundo (Alcamí et al., 1998; Graham et al., 1997). La proteína 35kDa representa un nuevo dominio estructural no encontrado en proteínas anteriormente, dos hojas- β paralelas están conectadas por largos *loops* y pequeñas hélices- α (Carfi et al., 1999). Otra vCKBP de VACV, A41, a pesar de presentar sólo un 19% de similitud con la 35K adopta un plegamiento muy parecido y también interacciona con el dominio de unión a GAGs de estas CKs (Bahar et al., 2008). Su ortólogo en ECTV no es capaz de inhibir la actividad las quimioquinas *in vitro* e interacciona con el dominio de unión a GAGs de las quimioquinas (Ruiz-Argüello et al., 2008). Por ultimo, las proteínas Crm unen quimioquinas a través de su dominio SECRET que presenta una estructura similar a la de las vCKBP 35K y A41 (Alejo et al., 2006; Xue et al., 2011).

A diferencia de los herpesvirus, en los poxvirus no es muy frecuente la expresión de versiones virales de las quimioquinas (vCKs) (Alcamí, 2003). Con la excepción de MOCV que codifica un homólogo de quimioquina (Damon et al., 1998). La expresión de homólogos de los receptores de quimioquinas por poxvirus es también limitada: MOCV codifica para MC148, la versión viral de CCR8 (Lüttichau et al., 2000), y YLDV codifica para un vCKRs de CCL1 (Najarro et al., 2003).

3.8.2 Modulación de la ruta ubiquitin-proteasoma

Los poxvirus replican en el citoplasma y necesitan por tanto instaurar un ambiente citoplasmático óptimo para su replicación. Está demostrado que la inhibición del proteasoma impide la liberación del nucleoide de su envuelta y en consecuencia la formación de factorías virales y la expresión de los genes tardíos de VACV causando una disminución importante en la replicación del virus (Mercer et al., 2012; Satheshkumar et al., 2009a). La importancia de la vía ubiquitina-proteasoma para los OPVs (Teale et al., 2009) queda de manifiesto por el hecho de que estos virus han desarrollado varias proteínas capaces de modular su actividad en su propio beneficio (Barry et al., 2010). Varios poxvirus codifican sus propias ubiquitin ligasas E3 (Barry et al., 2010). Por ejemplo, ECTV codifica para p28, una E3 tipo RING *finger* (*really interesting new gene*) muy conservada entre los poxvirus y que juega un papel muy importante en la patogénesis del virus (Senkevich et al., 1994). Los poxvirus, además, codifican por dos grupos de proteínas que interaccionan con las E3s: las proteínas de tipo kelch/BTB y anquirinas/F-box. Estas

proteínas interactúan con E3s activadas por cullina-3 y cullina-1, respectivamente (Barry et al., 2010). Los dominios kelch, BTB (*BR-C ttk and bab*, también conocido como POZ, *poxvirus and zinc finger*), anquirina, y F-box (también conocido como PRANC, *pox protein repeat of ankyrin C-terminus*) son motivos muy conservados que permiten la interacción proteína-proteína (Barry et al., 2010).

3.8.2.1 Proteínas anquirinas/F-Box

Las proteínas con dominios anquirinas celulares controlan la activación de NF- κ B (Hayden and Ghosh, 2008). Constituyen la familia de proteínas más grande entre las codificadas por OPVs y cada especie presenta un grupo específico de estos genes (Shchelkunov, 2012). El virus canarypox codifica para 51 proteínas anquirinas representando el 21% de su genoma (Tulman et al., 2004), CPXV, que presenta un rango de hospedador muy amplio, codifica para 14 proteínas de este tipo (Shchelkunov, 2012), mientras que VARV y VACV codifican para 5 y ECTV para 4. Algunas proteínas anquirinas codificadas por poxvirus contienen el dominio F-box en su región C-terminal. Esta combinación de dominios es única y sólo se encuentra de algunas proteínas de poxvirus como D3/H3, D8, y B3 de CPXV y las ortólogas EVM002, EVM005, y EVM154 de ECTV (Mercer et al., 2005; Sonnberg et al., 2008). Estas proteínas interactúan con el complejo multiproteico con actividad E3 conocido como SCF (*Skp, Cullin, F-box containing complex*) (van Buuren et al., 2008b).

3.8.2.2 Proteínas Kelch/BTB

Los poxvirus son los únicos virus que expresan proteínas muy parecidas a las proteínas kelch de *Drosophila* (BTB-kelch) (Shchelkunov et al., 2002). Las proteínas kelch presentan el dominio BTB en la región N-terminal y el dominio kelch en el extremo C-terminal. Entre los OPVs, CPXV contiene 6 genes que codifican para proteínas kelch/BTB, ECTV presenta 4 (EVM18, EVM27, EVM150, y EVM167) (Chen et al., 2003; Wilton et al., 2008), VACV sólo 3 (C2L, A55R, F3L), MPXV una (C9L) y VARV ninguna (Shchelkunov et al., 2002). La delección de estos genes en VACV no afectan a su capacidad de replicación *in vitro* indicando que probablemente las proteínas kelch/BTB tengan un papel *in vivo* (Kotwal and Moss, 1988; Perkus et al., 1991). En una infección intraperitoneal, la delección de cada uno de los genes EVM18, EVM27 o EVM167 disminuía la virulencia de ECTV *in vivo* (Kochneva et al., 2009). En ratones BALB/c infectados IN con un CPXV-GRI-90 delecionado en cada uno de los genes D11L, C18L, G3L, o A57R se observaba atenuación de la virulencia del virus, que disminuía sensibilmente si los cuatro genes eran ausentes (Kochneva et al., 2005). Se propuso que estos genes pueden estar implicados en la determinación del rango de hospedador y el tropismo celular (Shchelkunov, 2012).

3.8.3 Inhibición de apoptosis

Uno de los primeros mecanismos de defensa no-específicos contra los agentes infecciosos es la apoptosis (Hilleman, 2004). El TNF es capaz de iniciar el apoptosis activando la ruta de la caspasa-8. Para contrarrestar este mecanismo CPXV y VACV expresan los inhibidores de serin proteasas, CrmA y SPI-2, respectivamente, que bloquean tanto la actividad de la caspasa-8 (Dobbelstein and Shenk, 1996) y de la granzima B (Quan et al., 1995), como la de la caspasa-1 (Kettle et al., 1997). ECTV también codifica para un ortólogo de esta proteína (Turner et al., 2000), cuya delección reduce la virulencia de ECTV (Melo-Silva et al., 2011). ECTV codifica para otro inhibidor de la apoptosis muy conservado entre

los OPVs, p28, que bloquea la cascada de la caspasa-3 (Brick et al., 2000) y es también un factor de virulencia (Senkevich et al., 1994).

Las proteínas de la familia Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) son importantes reguladores del apoptosis (Youle and Strasser, 2008), y por este motivo los OPVs codifican para una familia de proteínas con un plegamiento tipo Bcl-2 capaces de inhibir la señalización de los TLRs a diferentes niveles inhibiendo la activación de NF- κ B y bloqueando la expresión de IFN (González and Esteban, 2010). VACV codifica para 9 de estas proteínas que tienen ortólogos en CPXV, ECTV, MPXV, y VARV y inhiben la activación de procesos inflamatorios (González and Esteban, 2010). Entre éstas encontramos N1, F1, B15 y A46. F1, actúa en las mitocondrias como inhibidor de la caspasa-9 (Yu et al., 2011). La proteína N1 (VACV-Cop) no presenta homología de secuencia con las Bcl-2 pero su estructura terciaria sí (Aoyagi et al., 2007) y es otro inhibidor de la apoptosis mediado por NF- κ B (Maluquer de Motes et al., 2011). A46 además es un inhibidor de la señalización de IL-1 (Bowie et al., 2000).

3.8.4 Otros mecanismos de inmunomodulación

Todos los poxvirus expresan un homólogo viral del factor de crecimiento epidérmico (VGF) que se ha descrito como un factor de virulencia (Buller et al., 1988b). En VACV, VGF es un producto de transcripción temprana capaz de inducir la proliferación en células quiescentes (Seet et al., 2003).

Tanto los poxvirus como los herpesvirus expresan homólogos de las semaforinas celulares (vSEMA). Las semaforinas celulares están implicadas en la respuesta inmune y inducción de crecimiento axonal (Seet et al., 2003). La vSEMA de VACV, A39, induce la producción de IL-6 y IL-8, modulando la inflamación. Sin embargo, su delección no altera la virulencia del virus en ratones (Seet et al., 2003).

Muchos poxvirus, entre los cuales se encuentran VACV, ECTV y MYXV, codifican para son homólogos virales de CD47, factor que modula la adhesión, la movilidad y la fagocitosis de los leucocitos (Seet et al., 2003). En MYXV, el CD47 viral es un importante determinante de virulencia mientras que en VACV no parece desempeñar un papel crítico *in vivo* (Cameron et al., 2005; Parkinson et al., 1995).

Todos los poxvirus bloquean la inmunidad humoral expresando proteínas de unión al complemento (VCP), más concretamente a los factores solubles C3 y C5 (Seet et al., 2003). La versión de VARV es mucho más potente de la de VACV a la hora de inhibir el complemento humano, remarcando la especialización de VARV con su huésped (Seet et al., 2003).

Finalmente, los poxvirus, como otros virus, han aprendido a prevenir la presentación antigénica de la célula infectada modulando negativamente o enmascarando la expresión de MHC-I. Durante la infección, MYXV provoca una disminución rápida de más del 90% en los niveles de MHC-I en membrana. CPXV también regula negativamente los niveles de MHC-I mediante las proteínas CPXV203, que retiene el MHC-I en el retículo endoplasmático (Byun et al., 2007) y CPXV012, que inhibe la translocación de los péptidos al MHC-I (Alzhanova et al., 2009). Esta disminución de la actividad de MHC-I puede activar las células NKs, mediadores críticos de la respuesta frente a poxvirus. Por este motivo CPXV y MYXV expresan la proteína OMCP (OPVs MHC-like protein) que interacciona con el receptor NKG2D de las células NK, bloqueando su activación (Campbell et al., 2007).

3.9 Historia y biología de ECTV

ECTV es el agente causal de *mousepox*, y fue descrito por primera vez en el 1930 por Marchal J. en colonias de ratones de laboratorio del *National Institute for Medical Research* en Hampstead, Londres, Reino Unido (Marchal, 1930). El lugar donde se aisló dio el nombre al primer aislado: ECTV-Hampstead. La enfermedad que Marchal describió era una enfermedad generalizada con lesiones en hígado y bazo que se caracterizaba por la inflamación y su posterior pérdida de la pata. Esta enfermedad se denominó *infectious ectromelia*, refiriéndose a la pérdida de la extremidad y a su carácter infeccioso (Marchal, 1930). Desde entonces, se han registrado brotes de ECTV en laboratorios de Europa, EE.UU., China y Japón, estableciéndose como enfermedad enzoótica de ratones de laboratorio (Fenner, 1981).

3.9.1 Aislados de ECTV

ECTV-Hampstead fue el primer aislado de ECTV, presenta un fenotipo V⁺ y se utilizó en todos los primeros estudios realizados sobre *mousepox* (Ichihashi and Matsumoto, 1966; Marchal, 1930). Sesenta pases de este virus en CAMs dieron lugar al aislado **ECTV-Hampstead Egg** que presentaba una considerable reducción de su virulencia en ratones multicolor *outbred* (Fenner, 1949b); y el mismo origen se propuso para el aislado **ECTV-Mill Hill** (Smith and Alcamí, 2000). En 1946, V. Soloviev aisló a partir de ratones de un laboratorio en Moscú un ECTV muy virulento e infeccioso que denominó **ECTV-Moscow** (Andrewes and Elford, 1947). En el mismo año, el aislado pasó de Andrewes a Fenner que lo distribuyó a investigadores de todo el mundo (Chen et al., 2003). Los experimentos de Andrewes y Elford y los de Fenner más tarde, describieron que ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead eran muy virulentos, el primero más que el segundo (Andrewes and Elford, 1947; Fenner, 1949b). En los años 50 en Ishibashi, Japón, hubo un brote de *mousepox* en una colonia de ratones de laboratorio. El causante era el virus **ECTV-Ishibashi** que presentaba un fenotipo V⁻. Este virus se atenuó tras más de 30 pases en cultivo (Ichihashi and Matsumoto, 1966). En el año 1976 hubo brotes en colonias de ratones en Munich y Nuremberg, de donde se aislaron **ECTV-MP1** y **ECTV-MP4**, respectivamente (Mahnel, 1983; Osterrieder et al., 1994). En los años 1986 y 1988 se detectaron brotes en ratones de animalario de la Universidad de Varsovia, Polonia, y los tres virus que se aislaron, **WAU86**, **WAU88-1** y **WAU88-2** se describieron como ECTV (Faundez and Niemialowski, 1990). En 1994 en Viena, ocurrió otro brote de ECTV y el aislado se denominó **ECTV-MP5**, (Osterrieder et al., 1994). Hasta la introducción en los animalarios de reglas estrictas sobre el manejo de los animales y barreras de contención de patógenos en las colonias de ratones, *mousepox* se estableció como enfermedad enzoótica en China y Japón mientras que se siguieron registrando brotes de ECTV en Inglaterra, Francia, Suiza, Suecia, Alemania, la antigua Checoslovaquia e Israel.

Sin embargo, nunca se registraron brotes en Australia y un estudio de los sueros de 150 ratones salvajes de los alrededores de Melbourne, Australia, no detectó la exposición a ECTV, sugiriendo la ausencia de este virus del continente australiano (Fenner, 1949a).

En EE.UU. tampoco se había establecido como enzootia, pero si se han producido numerosos brotes de ECTV en la segunda mitad del siglo XX por el intercambio de material biológico con laboratorios de Europa y Asia. El primer brote oficial de ECTV ocurrió en la universidad de Yale en el

1951 y tuvo como consecuencia la prohibición total para trabajar con este virus hasta los años 80 (Small and New, 1981; Wallace, 1981). Esto no solucionó el problema porque entre 1979-1980 ocurrieron una serie de brotes en animalarios de los cuales el más conocido fue el de **ECTV-NIH-79**, aislado virulento con fenotipo V⁺ que desafortunadamente se ha perdido (Allen et al., 1981). Estos brotes llevaron a la creación por parte del NIH de un comité de vigilancia. En 1996, hubo otro brote de ECTV en el *Naval Medical Research Institute* debido al uso de un suero comercial contaminado. El virus que se aisló, **ECTV-Naval**, mostraba una virulencia comparable a la de ECTV-Moscow (Dick et al., 1996; Labelle et al., 2009). En 1999 se detectó el último brote conocido en el *Weill Medical College of Cornell University*. Se comprobó que el origen eran sueros comerciales de ratón contaminados procedentes de China (Lipman et al., 2000). El virus aislado de este brote se denominó ECTV-Cornell. Con la introducción en los animalarios de niveles de bioseguridad que garantizan la contención de los agentes patógenos, los brotes de ECTV parecen haber desaparecido de las colonias de ratones (Lipman et al., 1999). Además, los niveles de bioseguridad de los animalarios actuales permiten limitar la infección a zonas del animalario, como ocurrió en el brote de ECTV-Cornell, y evitar el sacrificio masivo de todos los ratones del animalario, como ocurrió en el brote de ECTV-Naval. La existencia de drogas anti-virales contra ECTV, como ST-246 o la vacunación de colonias de ratones con VACV MVA permitirían la eliminación de un brote de ECTV actualmente (Huggins et al., 2009). Todos los aislados conocidos de ECTV proceden de brotes en colonias de ratones de laboratorio.

El único caso conocido de ECTV procedente de una infección natural fue aislado a partir de un ratón de campo en el año 2008 por el grupo del Dr. A. Nitsche, en la región de Krefeld, Alemania, y se le denominó **ECTV-MouKre08** (A. Nitsche, comunicación personal).

Eritromelalgia es una patología que afecta a humanos y se clasifica junto a los trastornos vasomotores funcionales y se caracteriza por la tríada de: eritema, calor y dolor de las extremidades. En 1988 se aisló un poxvirus, ERPV, desde muestras de garganta de pacientes que presentaban esta enfermedad (Zheng et al., 1988). Estudios *in vitro* de reactividad serológica, morfogénesis, rango de hospedador en cultivos celulares y en CAMs apuntaban a que ERPV constituyera un nuevo OPV o una subespecie dentro de ECTV (Zheng et al., 1992). En el trabajo del Dr. Zheng ZM se hace referencia a un aislado de ECTV chino (CECT) (*Chinese ectromelia virus strain* MB35) aislado de ratón en el 1962 por el Dr. Sun Ying Wu del CNIBDC (*The Chinese National Institute for Bioproduct and Drug Controls*), sin embargo no es posible encontrar en la literatura el artículo donde se describe este aislado (Zheng ZM et al., 1992). El genoma de ERPV, que se secuenció recientemente, reveló que este virus es muy parecido a ECTV-Naval y lo identifica como nuevo aislado de ECTV (Mendez-Rios et al., 2012). Por lo tanto ERPV representa el primer aislado de ECTV aislado de humano y además de origen chino.

3.9.2 El modelo de mousepox

La vía de entrada natural de ECTV ocurre a través de abrasiones en la piel por contacto directo con ratones infectados o fómites (Fenner, 1947). Por esta razón, en una infección de laboratorio se utiliza, como vía de inoculación, inyecciones subcutánea en la almohadilla plantar (*footpad*; FP). Frank Fenner describió por primera vez las fases de *mousepox* en 1948 (Figura I7) (Fenner, 1948). Tras una replicación inicial en el sitio de inoculación, el virus alcanza el ganglio que drena la región y el flujo

sanguíneo da lugar a una viremia primaria a los 2-3 días postinfección (dpi) (Esteban and Buller, 2005). El virus se replica a altos niveles en hígado, bazo y otros órganos linfoides. La replicación masiva del virus causa la necrosis en estos órganos, que en el caso del hígado podría ser la causa de la muerte en animales inoculados con altas dosis virales (Stanford et al., 2007).

En caso de supervivencia, ECTV vuelve al torrente sanguíneo (viremia secundaria) y provoca una infección sistémica caracterizada por la fuerte reacción inflamatoria y la aparición de las clásicas pústulas

ulcerosas en la piel (Esteban and Buller, 2005). El virus también es capaz de infectar ratones por la vía respiratoria e intraperitoneal.

ECTV y VARV son dos OPVs que presentan numerosas semejanzas. Ambos son muy virulentos, presentan un rango de hospedador muy restringido y establecen una enfermedad de carácter exantemático tras la inoculación de dosis muy bajas (Buller, 2004; Parker et al., 2010).

Además el hospedador natural de ECTV, el ratón, es un animal ampliamente utilizado en los laboratorios por su pequeño tamaño, su facilidad de manejo y cuidado, y su precio asequible. Una ventaja importante del modelo es que se conoce muy bien la genética del ratón y el funcionamiento de su sistema inmune, y se dispone de una amplia batería de reactivos comerciales. Estas consideraciones han llevado a proponer *mousepox* como modelo de *smallpox* (Buller, 2004; Parker et al., 2010).

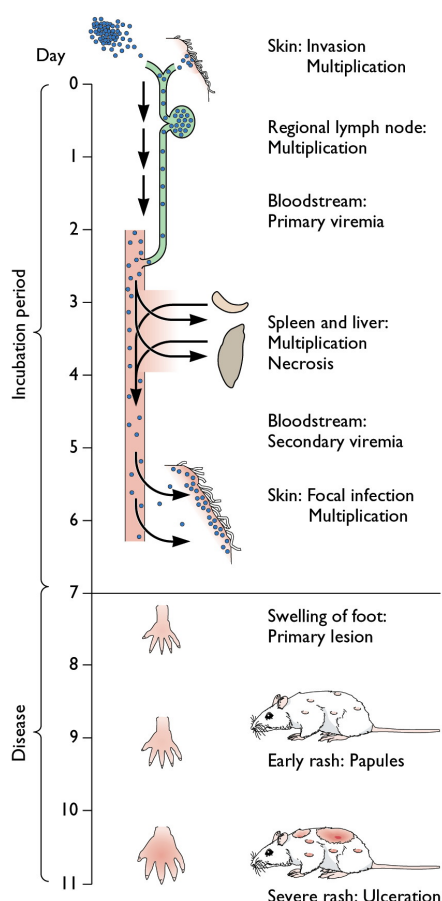


Figura 17. La evolución de *mousepox*. Se indican las etapas de la propagación del virus ECTV y la aparición de lesiones en la piel en un ratón. (Adaptación de (Fenner, 1948)

3.9.3 Respuesta inmunológica frente a ECTV

Todas la cepas de ratón son susceptibles de infección por ECTV, sin embargo presentan grados diferentes de enfermedad (Buller et al., 1986). Tras la inoculación por la ruta FP de cepas susceptibles como BALB/c, DBA/2 y A/J, la dosis letal 50 (DL₅₀) de ECTV es inferior a 1 unidad formadora de placa (ufp), mientras que cepas resistentes como C57BL6 (B6) y AKR/J la infección FP con ECTV es prácticamente asintomática (Esteban and Buller, 2005). Los estudios genéticos del Dr. David G. Brownstein identificaron 4 *loci* de resistencia a *mousepox* (*resistance to mousepox*: *Rmp*): *Rmp*-1, *Rmp*-2, *Rmp*-3 y *Rmp*-4 (Brownstein et al., 1989; Brownstein et al., 1992; Brownstein and Gras, 1995, 1997). El locus *Rmp*-1 incluye el complejo de genes NKR-P1 de las NK que codifican para receptores que regulan la actividad de estas. Los ratones DBA/2 no presentan este complejo génico mientras que los C57BL6 sí, demostrando el papel importante que juegan las células NK frente a una infección con ECTV (Burshtyn, 2013). El segundo locus contiene genes del complemento como C5, el tercero está vinculado al MHC-I y el cuarto mapea en el complejo de genes de selectinas, proteínas implicadas en el reclutamiento de

leucocitos (Esteban and Buller, 2005). Las cepas resistentes a *mousepox* desarrollan una potente respuesta celular al contrario de las cepas susceptibles (Chaudhri et al., 2004). La resistencia a *mousepox* de los ratones B6 se basa en la acción conjunta de IFNs, macrófagos, células NK, linfocitos y CD8 citotóxicos (Delano and Brownstein, 1995; Karupiah et al., 1996; Müllbacher et al., 1999a; Müllbacher et al., 1999b; Parker et al., 2007). Los macrófagos constituyen una parte importante de la respuesta innata frente a ECTV. Ratones B6 deficientes en macrófagos presentan una elevada carga viral en órganos y sucumben a la infección con ECTV a los 8 dpi (Karupiah et al., 1996). Una respuesta eficaz de las células NKs en las primeras fases de la infección también resulta esencial para resistir la infección por ECTV. Las células NK presentan un pico de actividad en los ganglios linfáticos a las 48 hpi, mientras que en bazo e hígado ocurre a los 6 dpi (Parker et al., 2007). También la respuesta celular CTL mediada por linfocitos T CD8⁺ parece importante para frenar la infección de ECTV ya que ratones deficientes en células T CD8⁺ sucumben a ECTV a los 10 dpi (Karupiah et al., 1996; Stanford et al., 2007). En conclusión, los fagocitos mononucleares son las células más importantes en el sitio primario de la infección, en los ganglios las células NKs son responsables de frenar la expansión del virus, mientras que la respuesta CTL interviene en los órganos diana como bazo e hígado para resolver la enfermedad. A partir de la cuarta semana de infección, la respuesta humoral y los anticuerpos también representan un importante mecanismo de defensa para la resolución definitiva de la enfermedad y la eliminación del virus. En ausencia de anticuerpos, ratones resistentes B6 sucumben a los 40 dpi (Chaudhri et al., 2006; Fang and Sigal, 2005; Panchanathan et al., 2008).

3.10 Las tecnologías de secuenciación de ADN: pasado y presente

En el 1975 Frederick Sanger desarrolló el método de secuenciación del ADN conocido como método Sanger y dos años más tarde se empleó esta técnica para secuenciar el primer genoma completo, el genoma del bacteriófago Phi-X174 (Sanger et al., 1977a; Sanger et al., 1977b). Desde entonces la secuenciación del ADN ha avanzado rápidamente llegando a ser hoy un producto industrial de empresas especializadas que han fusionado la robótica con la química y la bioinformática. En 2003 se concluyó el proyecto de secuenciación del genoma humano empezado en los años 90 utilizando secuenciación Sanger.

En 2004 Roche comercializó el primer secuenciador de nueva generación (NGS), 454 *FLX Pyrosequencer*, que tenía un coste por nucleótido leído seis veces inferior al de Sanger. En 2006 Illumina lanzó el Solexa 1G *Genetic Analyzer*, y un año después *Applied Biosystems* presentaba el sistema SOLiD. Estas compañías métodos de secuenciación distintos entre sí que se ajustan a diferentes necesidades experimentales. En 2007 Helicos BioSciences presentaba su tecnología HeliScope seguido, en 2010, de PacBio RS de Pacific Biosciences, compañía que en el 2013 lanzó una nueva versión capaz de producir lecturas de 5 kbp de media con secuencias de más de 20 kbp. Cada año estas empresas mejoran las prestaciones de sus instrumentos de secuenciación, aumentando el número y longitud de las lecturas, reduciendo el tiempo de secuenciación, el precio por nucleótido y el tamaño de los equipos.

La secuenciación masiva ha tenido un enorme impacto en campos tan dispares como el cáncer, la secuenciación *de novo* de todo tipo de organismos, la metagenómica, la transcriptómica, la paleogenómica, etc. En virología este avance tecnológico está facilitando la secuenciación y comparación de genomas virales de gran tamaño (Afonso et al., 2012; Lin et al., 2013; Mavian et al., 2012a; Mavian et al., 2012b; Mendez-Rios et al., 2012; Qin et al., 2013; Qin et al., 2011) o la determinación de comunidades naturales de virus (López-Bueno et al., 2009; Rohwer and Thurber, 2009) y la identificación de nuevos virus y patógenos (Radford et al., 2012; Shendure and Ji, 2008). La NGS presenta numerosas ventajas con respecto al método tradicional: el proceso de construcción de las librerías de ADN es mucho más sencillo y permite obtener secuencias de genes tóxicos o secuencias con nucleótidos no convencionales; la enorme capacidad de la NGS permite secuenciar con una cobertura muy alta en cada base, lo que aumenta la fiabilidad de los genomas obtenidos; sin embargo, la principal ventaja es sin duda la reducción del coste de secuenciación.

La gran cantidad de información generada con la NGS obviamente no es fácil ni de almacenar ni de manejar. En paralelo al desarrollo de la NGS se está avanzando en el campo de la bioinformática para facilitar la comparación con bases de datos, el alineamiento con genomas de referencia, o el ensamblaje *de novo* (Shendure and Ji, 2008).

El genoma de ECTV-Naval se secuenció por la tecnología de Sanger en 2002 por el Dr. Antonio Alcamí (Cambridge University, Reino Unido) en colaboración con el Dr. Bart Barrell en el Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, Reino Unido). Con este mismo método, uno año más tarde también se secuenció el genoma de ECTV-Moscow (Chen et al., 2003) mientras que la secuencia de ERPV se obtuvo mediante pirosecuenciación 454-Roche (Mendez-Rios et al., 2012). A diferencia del método Sanger, capaz de resolver aproximadamente 67 Kb cada hora, con el método 454-Roche se puede

determinar la secuencia de unos 10^3 millones de bases en 12 h abaratando enormemente el coste del proceso.

El desarrollo de la NGS permite la secuenciación del genoma de diferentes especies de virus relacionados o aislados de una misma especie. La comparación de estos genomas es una herramienta muy útil para entender su historia evolutiva e identificar nuevos determinantes de virulencia, lo que constituye el objetivo general de esta tesis.

4 Objetivos

La secuenciación de genomas de varias cepas relacionadas de un virus y el análisis de su capacidad infecciosa en un modelo animal ha sido una aproximación muy utilizada para identificar determinantes moleculares de virulencia y patogénesis. Debido al elevado coste de la secuenciación, esta aproximación se ha restringido tradicionalmente a familias de virus con genomas de tamaño pequeño. Sin embargo, el reciente desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación masiva y la consiguiente caída en los costes está facilitando enormemente la secuenciación de genomas virales de gran tamaño (Afonso et al., 2012; Lin et al., 2013; Mavian et al., 2012a; Mavian et al., 2012b; Mendez-Rios et al., 2012; Qin et al., 2013; Qin et al., 2011).

ECTV es el agente causal de *mousepox*, que en el pasado fue una enfermedad enzoótica en las colonias de ratones de animalarios de todo el mundo. ECTV es uno de los mejores modelos animales disponibles para el estudio del virus de la viruela debido a que comparten un estrecho rango de hospedador, una elevada virulencia y un ciclo de infección similar. Además, el modelo *mousepox* está permitiendo conocer mejor los mecanismos de inmunidad anti-viral y patogénesis, que pueden ser relevantes en infecciones por otros virus. El estudio de la historia evolutiva y la relación entre los aislados de ECTV está restringido por el escaso número de genomas secuenciados hasta el momento: ECTV-Moscow, ECTV-Naval y ERPV (Chen et al., 2003; Mendez-Rios et al., 2012).

Por ello, en esta tesis doctoral nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Secuenciar el genoma de 11 aislados de ECTV y establecer las relaciones filogenéticas entre ellos.
2. Identificar nuevos genes de ECTV implicados en virulencia y en el control de la inflamación mediante la comparación del contenido génico de los aislados de ECTV y su capacidad infecciosa en ratones BALB/c.
3. Definir el papel de los cuerpos de inclusión de tipo A durante la infección de ECTV *in vivo*.

5 Materiales y Métodos

5.1 Línea celular

La línea celular de epitelio renal de mono verde africano BS-C-1 (ATCC: CCL-26) ha sido la única línea celular utilizada en este trabajo de tesis. Estas células se crecieron a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% CO₂ en medio *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) suplementado con: 10% suero fetal bovino (FBS; Sigma) inactivado previamente a 56°C durante 30 min, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 µg/ml de una mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomicina (Sigma) y 25 µg/ml de gentamicina (Sigma).

5.2 Virus

Los aislados de ECTV empleados en esta tesis doctoral (Tabla MM1) fueron cedidos por diferentes investigadores:

- ECTV-Hampstead y ECTV-Mill Hill: J. Williamson (St. Mary's Hospital, Imperial College School of Medicine, Londres, Reino Unido) y derivan de los *stocks* originales de K. Dumbell.
- ECTV-Ishibashi I-111: Y. Ichihashi (Faculty of Medicine, Niigata University, Niigata, Japón).
- ECTV-Moscow-3-P2: R. M. L. Buller (School of Medicine, Saint Louis University, Missouri, EE.UU.) y procede del *stock* original de F. Fenner.
- ECTV-Naval: R. M. L. Buller y procede del *stock* original aislado en el Naval Medical Research Institute (Bethesda, Maryland, EE.UU.).
- ECTV-MP-1, ECTV-MP-4, y ECTV-MP-5: H. Meyer (Institute of Microbiology, Federal Armed Forces Medical Academy, Munich, Alemania).
- ECTV-Cornell: H. Meyer y N. Lipmann (Weill Medical College of Cornell University, Nueva York, EE.UU.).
- ECTV-Hampstead Egg: A. Mullbacher (John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra, Australia).
- ECTV-Moukre08/1: A. Nitsche (The Robert Koch Institute, Berlín, Alemania).

Los aislados de VACV utilizados en esta tesis doctoral (Tabla MM1) han sido cedidos por los siguientes investigadores:

- VACV-Western Reserve (WR): G. L. Smith (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, Reino Unido).
- VACV-WAU-86 y VACV-WAU88-1: M. Niemialtowski (Division of Virology, Department of Microbiology, Warsawia University, Varsovia, Polonia).

Los virus que se utilizaron en este trabajo fueron sometidos a un único pase de amplificación en células BS-C-1 desde los *stocks* originales. ECTV-Naval.Cam corresponde a una placa de lisis aislada del virus original que se aisló en nuestro laboratorio desde el bazo de un ratón infectado con ECTV-Naval tras tres rondas consecutivas de plaqueo en monocapas de células BS-C-1. Se comprobó que la

virulencia de ECTV-Naval.Cam en ratones BALB/c infectados era similar a la del virus parental ECTV-Naval (A. Alcamí, datos no publicados).

Tabla MM1: Origen de los aislados de OPVs utilizados en esta tesis.

Aislado	Nombre en el texto	Lugar del brote	Fecha	Origen	Aislado de placa	Referencia
ECTV-Hampstead	ECTV-Hampstead	<i>National Institute for Medical Research, Londres, Reino Unido</i>	1930	Brote en animalario	no	Marchal, 1930
VACV-Western Reserve	VACV-WR	-	1941	VACV-NYCBH pasado intracraneal en ratones	-	Parker et al., 1941
ECTV-Moscow 3-P2	ECTV-Moscow	Moscú , Rusia	1946	Brote en animalario	si	Andrewes and Elford, 1947
ECTV-Hampstead Egg	ECTV-Hampstead Egg	-	1949	Pases de ECTV-Hampstead en CAMs	no	Fenner, 1949
ECTV-Mill Hill	ECTV-Mill Hill	-	1959	Pases de ECTV-Hampstead en CAMs	no	(Smith and Alcamí, 2000)
ECTV-Ishibashi I-111	ECTV-Ishibashi	Ishibashi, Japón	1966	Brote en animalario y pases en cultivos celulares	si	Ichihashi and Matsumoto, 1966
ECTV-MP1	ECTV-MP1	Munich, Alemania	1976	Brote en animalario	no	Mahnel, 1983
ECTV-MP4	ECTV-MP4	Nuremberg, Alemania	1976	Brote en animalario	no	Osterrieder et al., 1994
VACV-WAU86	VACV-WAU86	Warsovia University, Varsovia, Polonia	1986	Brote en animalario	no	Faundez and Niemialowski, 1990
VACV-WAU88-1	VACV-WAU88-1	Warsovia University, Varsovia, Polonia	1988	Brote en animalario	no	Faundez and Niemialowski, 1990
ECTV-MP5	ECTV-MP5	Viena, Austria	1994	Brote en animalario	no	Osterrieder et al., 1994
ECTV-Naval.Cam	ECTV-Naval	<i>Naval Medical Research Institute, Bethesda, EE.UU.</i>	1995	Brote en animalario	si	Dick et al., 1996
ECTV-Cornell	ECTV-Cornell	<i>Weill Medical College of Cornell University, Nueva York, EE.UU.</i>	1999	Brote en animalario	no	(Lipman et al., 2000)
ECTV-MouKre08/1	ECTV-MouKre	Región de Krefeld, Alemania	2008	Ratón de campo	no	No publicado, cortesía de Andreas Nitsche

5.3 Preparación de stocks de virus

Entre 3×10^7 y 10^8 células BS-C-1 fueron infectadas a una multiplicidad de infección (moi) de 0,01 unidades formadoras de placa (ufp) por célula en DMEM al 2,5% de FBS. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y las células se incubaron en DMEM al 2,5% de FBS hasta la aparición de un efecto citopático completo, típicamente 5-6 dpi. Las células levantadas con espátula se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 min y el sedimento se resuspendió en 1 ml de Tris-HCl 10 mM pH 9.0 (previamente filtrado por 0,22 μ m). La incubación en este tampón durante 10 min en hielo y 35 pases por jeringa con aguja 25G lisaron completamente las células como se pudo observar al microscopio. A continuación, para eliminar el debris celular y los núcleos, la muestra se centrifugó a $900 \times g$ durante 10 min a 4°C, se guardó el sobrenadante

y el sedimento se volvió a tratar del mismo modo. Los dos sobrenadantes obtenidos se purificaron a través de un colchón de sacarosa al 36% en Tris-HCl 10 mM pH 9.0 mediante ultracentrifugación a 20.000xg durante 1 h a 4°C en un rotor SW 32 Ti Swinging-Bucket y en una ultracentrífuga Optima L100XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Finalmente, se resuspendió el sedimento en 500 µl de Tris-HCl 10 mM pH 9.0 y se preservó en alícuotas a -80°C.

5.4 Ensayos de formación de placa de lisis

Para determinar el título de un *stock* de virus, se infectaron monocapas semiconfluentes de células BS-C-1, sembradas en placas M6, con diluciones seriadas de los *stocks* virales en DMEM al 2,5% FBS. Tras 1 h de adsorción, se añadieron a cada pocillo 2 ml de medio de plaqueo semisólido. Este medio se preparó mezclando 1:1 Carboximetilcelulosa (CMC; Sigma) de viscosidad alta (1500-3000 cps) y baja (50-200 cps) a la concentración final de 0,3% en DMEM al 2,5% FBS. Después de 5 d de infección, se fijaron las células durante 30 min con formaldehído al 2% y se tiñeron con una mezcla de cristal violeta al 2% y formaldehído al 2% durante 15 min. Finalmente, se retiró la tinción, se aclaró con agua y se contaron las placas de lisis en cada dilución para expresar el título viral en upf/ml.

5.5 Ensayos de infección *in vitro*: ciclo único y progresión

Para el ensayo de ciclo único de infección se infectó una monocapa preconfluente de células BS-C-1 con una moi de 3,5-10 ufp por célula (ufp/c) en DMEM al 2,5% FBS. A las 0, 3, 7, 11 y 24 h postinfección (hpi) se rasparon las células en el medio cultivo. Para el ensayo de progresión de la infección, se infectó una monocapa semiconfluente de BS-C-1 con moi 0,01 ufp/c en DMEM al 2,5% FBS. A las 24, 48 y 72 hpi se rasparon las células infectadas, se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 min y se resuspendieron en Tris-HCl 10mM pH 9. Tanto las muestras obtenidas del ensayo de ciclo único como las de progresión se congelaron y descongelaron 3 veces consecutivas en nieve carbónica y baño a 37°C, respectivamente, antes de determinar la producción viral en ensayos de formación de placa de lisis. Adicionalmente, se determinó también el título de los inóculos virales utilizados.

La morfología y velocidad de progresión de las placas de lisis de los aislados de ECTV se determinaron plaqueando 200 upf en células BS-C-1 y tomando fotografías en un microscopio de contraste de fase con una cámara Leica DM IL LED (Leica Microsystems) a las 48, 72, 96, 120 y 144 hpi.

5.6 Purificación y amplificación de ADN viral

Para extraer el ADN viral, se partió de un *stock* de virus obtenido como se describe en el apartado 5.3. Tras la ultracentrifugación en colchón de sacarosa, el sedimento viral se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con una mezcla de DNAsas (500 U/ml de DNasa I, 500 U/ml de Nucleasa Micrococcal S7 y 20 µg/µl de RNasa A; Roche) en un tampón 40 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de NaCl, 1 mM de CaCl₂ y 10 de mM de MgCl₂ para digerir el material genético no protegido por cápsidas o envueltas. La acción de las nucleasas se detuvo mediante la adición de EGTA 2 mM y EDTA 12 mM e incubando la muestra 10 min a 75°C. Para romper las cápsidas y liberar el ADN viral se añadieron 200 µg/ml de proteinasa K (Invitrogen) y 0,5% de dodecilsulfato sódico (SDS) y se incubó 1 h a 45°C. El ADN viral se recuperó mediante una extracción clásica por fenol-cloroformo y se precipitó en presencia de 0.1

volúmenes de acetato sódico 3M pH 5,3, 10 µg de glicógeno de ostra (Roche) como *carrier* y 3 volúmenes de etanol (EtOH) absoluto, incubando a -80°C toda la noche. Tras centrifugar a 13,000 rpm en una centrífuga de mesa a 4°C 30 min, el sedimento se lavó con EtOH al 70% y se resuspendió en 20 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8. Para separar los fragmentos de tamaño pequeño correspondientes a los restos de ADN y ARN celular digerido de los genomas virales, se cargó la muestra en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (MicroSieve Clone LM agarose de Flowgen Bioscience). Se recuperó el ADN viral cortando la banda correspondiente que migraba por encima de los 10 Kbp de la banda mayor del marcador de peso molecular. El ADN extraído de banda (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen) se amplificó al azar mediante “Amplificación por desplazamiento múltiple de banda” usando oligonucleótidos degenerados (5'-NNNNNN-3') y la ADN polimerasa del bacteriófago Phi29 (illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit; GE Healthcare, United Kingdom) siguiendo las indicaciones del proveedor pero incubando a 30°C durante 2 h y 45 min. El ADN amplificado por Phi29 se precipitó incubando 2 min con 150 µl de EtOH absoluto, se lavó con EtOH al 75% y se resuspendió en 10-20 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8. La presencia de ADN viral se confirmó por PCR con oligonucleótidos que amplifican genes de ECTV o VACV. También se controló por PCR la presencia de contaminaciones de genomas bacterianos con los oligonucleótidos 27f-5' y 1492-3' que amplifican entre las posiciones 27 y 1492 del gen de ARN ribosómico 16S (Figura MM1) (Frank et al., 2008).

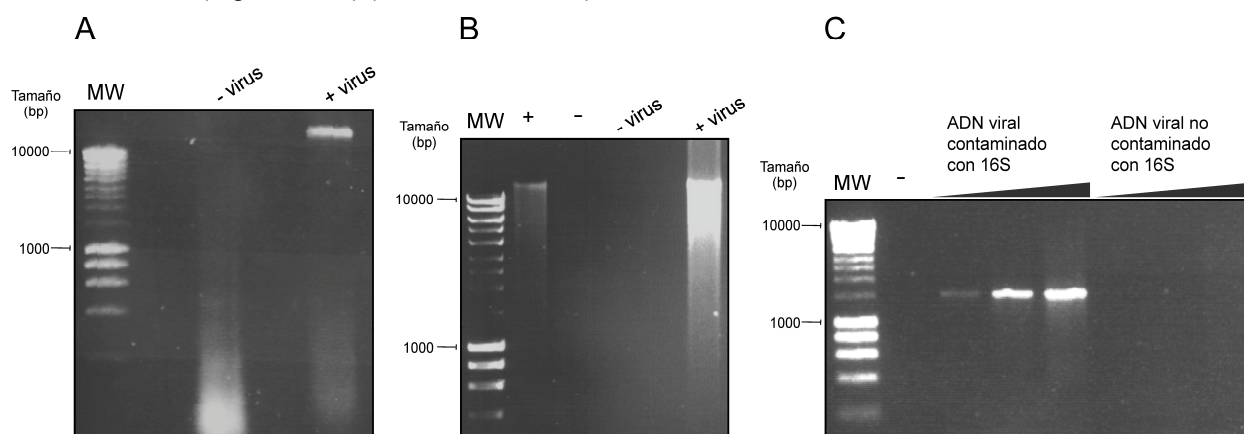


Figura MM1. Protocolo de purificación del genoma de poxvirus. (A) Electroforesis del ADN extraído de células BS-C-1 infectadas con virus y sin infectar, la banda que corresponde al ADN viral se corta de gel para ser purificada y (B) amplificada con la ADN polimerasa del bacteriófago Phi29 del ADN. (C) Productos de PCRs con oligonucleótidos específicos para el genoma de ECTV y para el gen de ARN ribosómico 16S de bacteria.

5.7 Secuenciación *de novo*

Para secuenciar *de novo* los aislados de ECTV y VACV, se utilizó principalmente la técnica de pirosecuenciación de 454-Roche. Adicionalmente, se utilizó la tecnología de secuenciación de Illumina para re-secuenciar el genoma del aislado ECTV-Naval. El genoma de este virus se secuenció anteriormente en nuestro laboratorio por Dr. Antonio Alcamí en colaboración con el Dr. Bart Barrell (*Wellcome Trust Sanger Institute*, Hinxton, Cambridge, Reino Unido) por el método de Sanger (http://www.poxvirus.org/map.asp?genome_id=1499). La preparación de las librerías y la secuenciación se llevó a cabo en el servicio de genómica del Parque Científico de Madrid utilizando los equipos *Genome Sequencer FLX+ System* de 454-Roche. Los aislados ECTV-Hampstead, ECTV-Hampstead Egg y ECTV-Naval, y parte de las lecturas de ECTV-Ishibashi y ECTV-MP5, se secuenciaron en la empresa

LifeSequencing (Valencia). Entre 2 y 5 µg de ADN viral amplificado se fragmentaron por nebulización siguiendo las recomendaciones de los proveedores para la preparación de librerías 454-Roche *GS FLX Titanium system*. Las muestras marcadas con adaptadores (MIDs) se secuenciaron en una superficie equivalente a una placa completa. En el caso de la ultrasecuenciación por Illumina y se preparó una librería TruSeq, con fragmentos ligados a adaptadores de un tamaño aproximado de 400-500 bp y se secuenció en décima parte de una línea de placa.

En el caso de la pirosecuenciación 454-Roche (www.454.com), los extremos de las moléculas de ADN se hicieron romos y se defosforilaron antes de unirlos a nano-esferas. Éstas se embebieron en gotas de aceite y las moléculas de ADN ancladas se amplificaron mediante PCR en emulsión. A continuación, las nanoesferas se repartieron en placas donde cada nanopocillo contiene el tamaño exacto para acomodar una sola nanoesfera y los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de secuenciación. La pirosecuenciación se basa en la liberación de un pirofosfato durante la incorporación de cada nucleótido y la emisión de fotones de luz en una reacción asociada que implica al enzima luciferasa. Esta señal luminosa es captada por una cámara CCD y la cantidad de luz es proporcional al número de bases incorporadas (Shendure and Ji, 2008).

En el caso de la secuenciación con Illumina (www.illumina.com), los extremos de los fragmentos de ADN se ligaron a unos adaptadores que permitían su anclaje a una placa de vidrio que presenta en su superficie oligonucleótidos complementarios. Estos oligonucleótidos se emplearon también para su amplificación *in situ* generándose *clusters* de ADN. El siguiente paso consistió en la secuenciación mediante síntesis utilizando los cuatro nucleótidos marcados con moléculas fluorescentes de distintos colores. Un equipo de alta resolución de captura de imagen detectó la señal de las moléculas fluorescentes y determinó la secuencia de nucleótidos incorporados (Shendure and Ji, 2008).

Las secuencias obtenidas se compararon por Blastx contra la base de datos nr del genbank y la asignación taxonómica a los diferentes dominios se hizo con el programa MEGAN 4 (Huson et al., 2007).

Tabla MM2: Comparación de las tecnologías de secuenciación masiva 454-Roche e Illumina.

Características	454-Roche	Illumina
Método de secuenciación	Liberación de pirofosfato	Síntesis
Material de partida	1-3 µg ADN	0,5-2 µg ADN
Rendimiento*	450-700 bp, 1 millón	75-150 bp, 320 millones
Precisión	99,997 % Error en homopolímeros > 6 nt	99,999%
Duración de la carrera	1 día	3-5 días
Coste	13.600€ / Gb	96€ / Gb

Se comparan los equipos y los *kits* de las dos tecnologías del Parque Científico de Madrid utilizados para la secuenciación de los aislados de OPVs con características y costes actualizados al 2013. (*) número de lecturas y su longitud por placa secuenciada.

5.8 Ensamblaje del genoma viral

Las lecturas obtenidas por 454-Roche se ensamblaron con las herramientas del programa Newbler 2.5.3 (454 Life Science Corp, Branford, CT) en tres pasos:

1. Se utilizó la herramienta *GS Reference Mapper* para alinear las lecturas con un genoma de referencia, exigiendo una identidad mínima del 95% en al menos un 90% de la longitud cada lectura.

En el caso de los aislados de ECTV se utilizaron como referencia los genomas disponibles de ECTV-Naval (http://www.poxvirus.org/map.asp?genome_id=1499) y ECTV-Moscow (NC_004105.1, GI:22164589). En el caso de los aislados de VACV se utilizó como referencia el genoma de VACV Lister (AY678276.1, GI:56713624). El genoma así obtenido cubría la mayor parte del genoma con la excepción de las regiones terminales repetidas y estaba contenido en un único *contig* en el caso de los aislados de VACV o en dos *contigs* separados por una región de repeticiones entre las posiciones 39.026 y 39.745 en el genoma de ECTV-Moscow.

2. Se hizo un ensamblaje *de novo* con la herramienta GS *De Novo Assembler*, fijando esta vez una identidad mínima del 97% y un solapamiento mínimo del 90%, para recuperar las regiones de los extremos 5' y 3' de los genomas y reconstruir un primer genoma de referencia completo para cada aislado.
3. Este genoma de referencia se utilizó como molde para un segundo alineamiento con GS *Reference Mapper* al 97% de identidad y con un solapamiento mínimo del 90%.

La región de repeticiones no resuelta en los aislados de ECTV está compuesta por un número variable de la secuencia de 24 nt "TCTATATCCTGTACTATACCATTA". Se estimó el número de estas repeticiones en cada aislado, amplificando la región por PCR y cargando el producto de PCR en un gel de agarosa al 2%. Se utilizó una escalera de 100 bp como marcador (Invitrogen) y el número de repeticiones se obtuvo al interpolar la distancia migrada en una recta patrón generada al representar la distancia de migración de cada banda del marcador frente al logaritmo del número de pares de bases.

Para el ensamblaje de las lecturas del aislado ECTV-Naval obtenidas por Illumina se utilizó el programa CLC-Genomics Workbench 5.5.1 (CLC bio), mapeando las lecturas en el genoma de referencia de ECTV Naval obtenido por Sanger con un solapamiento mínimo del 90% y una identidad del 95% en dicho solapamiento. Aquellas regiones con homopolímeros de más de 5 nucleótidos que provocaban un cambio de pauta de lectura en los genes de los distintos aislados de ECTV (posiciones en el genoma de ECTV-Moscow: 15.898, 20.550, 66.587, 73.396, 91.876, 105.668, 127.056, 132.201, 150.890 y 165.162) se amplificaron por PCR y secuenciaron por el método de Sanger, en el servicio de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM). También se secuenciaron 4 posiciones del genoma de ECTV-Moscow (13.526, 39.775, 41.907 y 102.467) que diferían con todos los otros aislados secuenciados y afectaban respectivamente a los genes EVM008, EVM025, EVM028 y EVM089.

5.9 Anotación del genoma

El análisis genómico y la anotación se llevó a cabo con las herramientas de Artemis (Wellcome Trust Sanger Institute; (Rutherford et al., 2000) y con el programa GATU (Genome Annotation Transfer Utility) del Viral Bioinformatics Resource Center (<http://athena.bioc.uvic.ca/virology-ca-tools/gatu/>). Se anotaron como genes solo aquellas pautas de lectura abiertas (open reading frames; ORFs) que cumplieran los siguientes requisitos: que codificaran por proteínas que tuvieran un mínimo de 40 aa; que presentaran similitud de secuencia con algún ortólogo de función conocida en poxvirus; que conservaran el sitio activo de dicha función. Aquellos genes fragmentados por inserciones o deleciones pero que presentaban similitud por ortólogos de función conocida en otros poxvirus se anotaron como

pseudogenes. La organización genómica del aislado ECTV-Naval se representó gráficamente usando el programa Artemis.

5.10 Comparación de los genomas

Los genomas se compararon a nivel de nucleótido con el programa Geneious Pro 6.1 (Biomatters, <http://www.geneious.com>) que permitió obtener el porcentaje de identidad y el número de bp diferentes entre todos los aislados. Para obtener una representación gráfica del alineamiento de los genomas de ECTV generado por blastz (*smooth plot*) se utilizó la herramienta mVista (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>). El *smooth plot* de los genomas de ECTV y CPXV-BR frente al aislado de referencia ECTV-Moscow se hizo representando el porcentaje de identidad por ventanas de 100 bp a lo largo del genoma. En estos análisis, no se tuvieron en cuenta las regiones repetidas de los extremos del genoma (posiciones 1-1.548 y 208.224-209.771 del genoma de ECTV-Moscow) y se redujo la región con repeticiones de 24 nt hasta un número arbitrario de 15 repeticiones igual para todos los aislados de ECTV analizados. Las comparaciones entre las proteínas de todos los aislados de ECTV se hicieron con clustaw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

5.11 Análisis filogenético

Para estudiar la relación filogenética entre los aislados de ECTV se construyó un árbol con el programa MEGA5 (Tamura et al., 2011) basado en un alineamiento (clustaw2) de cerca de 64 Kbp de la región central conservada (posiciones 74.472 a 138.348 del genoma de ECTV Moscow; (Esposito et al., 2006). El árbol se obtuvo por el método *neighbour joining* (NJ) con *bootstrap* de 10^3 . Además de los genomas secuenciados en este trabajo, para estos análisis filogenéticos se han utilizado: el genoma de ECTV-Naval, el genoma de ECTV-Moscow y el genoma de ERPV (JQ410350.1, GI:383866716).

Para el análisis filogenético de los aislados de VACV se utilizaron los genomas secuenciados en este trabajo y los genomas: VACV WR (NC_006998.1, GI:66275797), VACV-Ankara (U94848.1, GI:2772662), VACV-Lister clone VACV107 (DQ121394.1, GI:119352440), VACV-Lister, VACV-LC16mO (AY678277.1, GI:56713625), VACV-LC16m8 (AY678275.1, GI:56713341), VACV-DUKE (DQ439815.1, GI:90819652), VACV-Copenhagen (M35027.1, GI:335317), VACV-Ankara chorioallantois vaccinia virus Ankara (AM501482.1, GI:160857876), VACV-3737 (DQ377945.1, GI:88900616), VACV GLV-1h68 (EU410304.1, GI:167412463), VACV-Dryvax clone DPP19 (JN654984.1, GI:373449076), VACV-Tian Tian (AF095689.1, GI:6969640), virus rabbitpox (RPXV) (AY484669.1, GI:44971363), virus horsepox (HSPV)-MNR-76 (DQ792504.1, GI:111184167). En ambos análisis se utilizaron como *outgroup* los genomas de los orthopoxvirus CPXV-BR (AF482758.2, GI:30795158), MPXV-Zaire 96 (NC_003310.1, GI:17974913) y VARV-Bangladesh 1975 (L22579.1, GI:623595).

5.12 Microscopia electrónica

Las muestras procedentes de cultivos celulares se prepararon a partir de 10^6 células BS-C-1 infectadas con 10 ufp/c con los diferentes aislados de ECTV. A las 24 hpi se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y glutaraldehído (GDA) al 2% en tampón fosfato (PBS) 0.1 M pH 7.4 durante 60 min a temperatura ambiente. Tras 3 lavados de 10 min con PBS pH 7.4, las células se rasparon en 1 ml de PBS suplementado con BSA al 2%.

Las muestras de bazos de ratones BALB/c (Charles River) infectados se fijaron con PFA al 4% y GDA al 2% en PBS 0.1 M pH 7.4 durante 90 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces 10 min con PBS pH 7.4. A continuación, tanto las muestras provenientes de células infectadas como las de bazos infectados, se trataron con 1% Osmio y 1% FeCl₃ en agua destilada (dH₂O) durante 60 min a 4°C en oscuridad para fijar los fosfolípidos de las membranas. Se lavaron 3 veces con dH₂O durante 5 min a 4°C y se volvieron a fijar esta vez con 0,15% ácido tánico en PBS 0.1 M pH 7.4 para obtener más contraste en las membranas. Un min después se lavaron con PBS durante 5 min y 2 veces más con dH₂O. Se incubaron con acetato de uranilo al 2% en dH₂O durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad para contrastar proteínas y ácidos nucleicos. Finalmente, se lavaron con dH₂O 2 veces y se deshidrataron con soluciones crecientes de EtOH: 50%, 70%, 90%, 95% y 100% cada una durante 10 min a 4°C. La inclusión en resina Epon (resina Epoxi, TAAB812, TAAB Laboratories, Berkshire, England) se realizó sumergiendo la muestra de forma consecutiva en mezclas Epon: EtOH 1:2, 1:1 y 2:1 durante 60 min a temperatura ambiente, y por último con Epon toda la noche a 4°C. Al día siguiente se cambió la resina y se dejó polimerizar a 60°C durante 48 h. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico JEM1010 (Jeol, Japón) a 80 kV y las imágenes se obtuvieron con una cámara TemCam-F416 (TVIPS, Gauting, Germany) a un aumento de 10.000x.

5.13 Experimentos de infección en ratones

Los experimentos de infección en ratones (modelos *mousepox*) se llevaron a cabo en un laboratorio con nivel de bioseguridad 3 (BSL3) en el animalario del CBMSO para garantizar la contención del agente patógeno. Se utilizaron siempre ratones hembras BALB/c (Charles River y Harlan) con una edad de 6 semanas. Los animales en grupos de 5 individuos se alojaron en jaulas de un *rack* ventilado específico para BSL3 (Allentown, USA). De esta forma, cada jaula tiene ventilación individualizada evitando posibles contaminaciones entre grupos. Los animales tenían acceso a agua y comida *ad libitum* durante todo el experimento y ciclos regulares de luz-oscuridad de 12 h. Una vez establecidos los grupos de animales, estos se dejaron una semana para su acondicionamiento antes de iniciar los experimentos. La ruta de infección para los aislados de ECTV fue por inyección subepitelial en la almohadilla de la pata (FP) con 10 µl de diferentes dosis del *stock* de virus semipurificado por colchón y diluido en PBS con BSA al 0,1%. La ruta de infección de los aislados de VACV fue intranasal, haciendo respirar a cada ratón 10 µl de las diferentes dosis del virus. En cada experimento se monitorizó también un grupo de ratones control que se inocularon con 10 µl de PBS con BSA al 0,1% (ratones control).

5.13.1 Ensayos de dosis letal 50 (DL₅₀)

La DL₅₀ de un virus se define como la dosis necesaria para matar al 50% de los animales infectados. Grupos de 5 ratones BALB/c (Charles River o Harlan) fueron inoculados con diluciones seriadas de orden 10 de los distintos aislados de ECTV y VACV. Se siguió la evolución de la enfermedad durante al menos 20 d en los que tomaron diariamente datos individuales para cada ratón. Se midió el peso y la inflamación de la pata inoculada, y se valoraron los síntomas generales que indican la evolución de la enfermedad utilizando una escala de 4 puntos en función del estado del pelo, postura encorvada, movilidad u otros síntomas que se pudieran apreciar. Un **0** corresponde a un animal sano; un **1**

corresponde a un animal que presenta el pelo ligeramente erizado; un **2** corresponde a un animal que presenta el pelo muy erizado y una postura ligeramente encorvada al caminar; un **3** corresponde a un animal con postura muy encorvada, un pelo más erizado que en el anterior y movilidad reducida; un **4** es un animal que presenta, además de todo lo anterior, movilidad nula, temblores o lesiones severas en la piel. En este experimento de DL_{50} se estableció que un animal con una pérdida de peso superior al 30% de su peso máximo debía ser sacrificado. Adicionalmente, también se sacrificaron animales con pérdida superior al 25% de su peso máximo y con más de 3 d de puntuaciones superiores a 3. Los procedimientos de la experimentación animal fueron aprobados por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Comisión de Seguridad Biológica del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, y se han llevado a cabo siguiendo las recomendaciones de la legislación vigente sobre experimentación con animales de laboratorio.

5.13.2 Ensayos de diseminación viral

En estos experimentos grupos de ratones BALB/c (Charles River) se infectaron con 10 ufp y se sacrificaron a 3, 5 y 7 dpi. A día 3 se extirparon los ganglios poplíteos que drenan la pata infectada, el bazo y el hígado. A 5 y 7 dpi se extirparon bazo, hígado y pulmón. Los órganos se lavaron en PBS y se pesaron húmedos antes de congelarlos a -20°C .

5.13.3 Ensayos de transmisión viral en ratones

Para estos ensayos, grupos de ratones BALB/c (Charles River) se infectaron por la almohadilla plantar con 10^3 ufp de los virus. A diferentes dpi, 2 ratones infectados se pusieron en contacto con 4 ratones sanos. Tras 3 días de exposición a los ratones enfermos, los ratones sanos se aislaron y se esperó una semana (7 días post-exposición, 7 dpe) para que el virus transmitido pudieran replicar y extenderse. Se analizaron 3 grupos de animales con distintas ventanas de exposición: 2-5 dpi, 4-7 dpi y 6-9 dpi. Un grupo adicional de ratones sanos se expuso durante 7 d al serrín sucio de ratones infectados con 10^3 ufp recogido a los 6 dpi y mantenido sin animales durante otros 6 días. En todos los casos los animales se sacrificaron a los 7 dpe y se extrajo el bazo para determinar su carga viral en ensayos de placa de lisis.

5.13.4 Determinación del título viral en los órganos

Los órganos recogidos en las disecciones se homogenizaron utilizando el equipo TissueLyser II de Qiagen. Por ello, se añadió a los tejidos PBS al 10% peso/volumen y una bola de acero inoxidable del diámetro de 5 mm (Qiagen). La vibración de la bola de acero en pulsos de 1 min a 30 Hz proporcionó la fuerza mecánica suficiente para alcanzar una homogeneización completa del tejido. En general, se repitió el proceso de disgregación 2 veces para el hígado, 4 veces para el pulmón y 5 veces para el bazo. Para determinar la carga viral de los órganos, se infectaron monocapas preconfluentes de células BS-C-1 con distintas diluciones de los homogenados (diluciones seriadas entre 10^{-1} y 10^{-6}) en DMEM al 2,5% FBS como se describe en el punto 3.1.

5.13.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Para evaluar si las diferencias de título viral en los experimentos *in vivo* eran estadísticamente

significativas ($P < 0,05$, $P < 0,01$) se aplicó un test Mann-Whitney de doble cola no-paramétrico que no tiene en cuenta de una distribución Gaussiana de los datos.

6 Resultados

6.1 Análisis y comparación del genoma de aislados de ECTV

Actualmente, se dispone de la secuencia completa de sólo tres ECTV: ECTV-Moscow y ECTV-Naval obtenidas con el método de secuenciación Sanger (Chen N et al 2003; Alcamí A no publicado) y ERPV que se obtuvo en 2012 mediante pirosecuenciación (Méndez-Ríos JD, 2012).

Con el objetivo de definir las relaciones filogenéticas entre OPVs de la especie ECTV e identificar nuevos genes implicados en virulencia, en este trabajo se han secuenciado 11 nuevos OPVs: 9 aislados de ECTV y 2 de VACV (Figura R1). Estos dos últimos, VACV-WAU88-1 y VACV-WAU86, fueron descritos previamente como aislados de ECTV (Faundez and Niemialtowski, 1990) y por esta razón se han secuenciado en este trabajo.

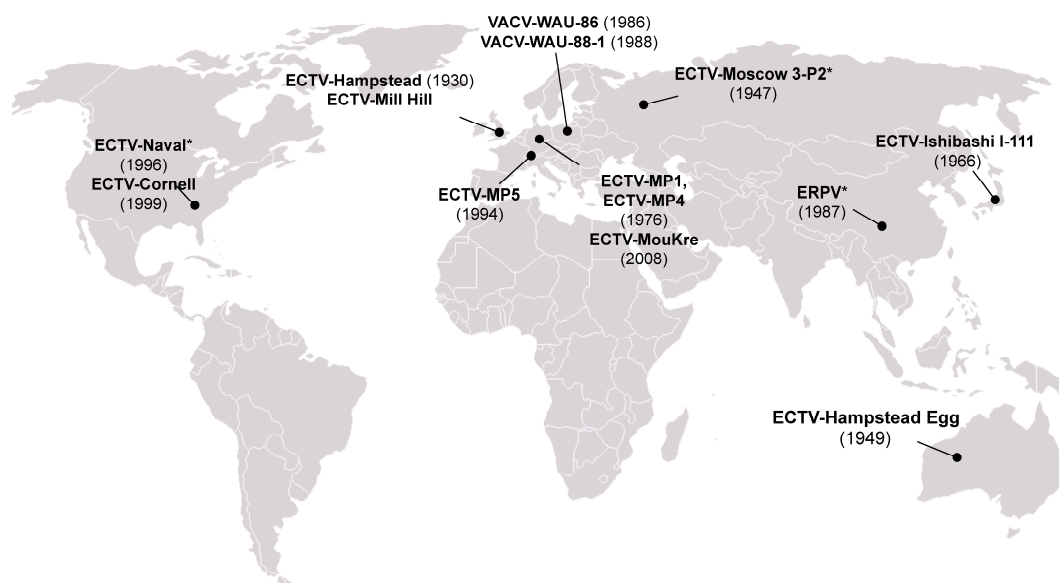


Figura R1. Origen geográfico y año de aislamiento de los OPVs estudiados en esta tesis. Con un (*) se indican aquellos aislados cuyo genoma había sido secuenciado antes de este trabajo.

Como se puede ver en la Figura R1, los 9 aislados de ECTV proceden en su mayoría de brotes en animalarios distribuidos por todo el mundo (ECTV-Hampstead, ECTV-Moscow, ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5, ECTV-Cornell, VACV-WAU88-1 y VACV-WAU86), otros tres virus se han pasado extensivamente en cultivos celulares o CAMs (ECTV-Mill Hill, ECTV-Ishibashi y ECTV-Hampstead Egg) y ECTV-MouKre representa el único aislado conocido procedente de un ratón de campo (Figura R1). Adicionalmente, resecuenciamos el genoma de ECTV-Naval con las tecnologías de 454-Roche e Illumina.

6.1.1 Pirosecuenciación del genoma de 10 aislados de ECTV

Los genomas de los aislados se secuenciaron por pirosecuenciación (454-Roche). Se obtuvieron 845855 lecturas utilizando los servicios de la empresa Lifesequencing S.L. (Valencia) y del Parque Científico de Madrid, que sumadas a las 112.670 lecturas de ECTV-MouKre obtenidas en colaboración con el grupo de A. Nitsche (The Robert Koch Institute, Berlín, Alemania), suponen un total de 958.525 lecturas y cerca de 380 millones de nucleótidos. La cantidad de lecturas para cada virus varió de 25.360 a 240.573 con un tamaño medio que varió entre 302 y 396 bp (Tabla R1). Se analizó la composición de cada conjunto de lecturas mediante un blastx contra la base de datos de proteínas nr del Genbank. En

un primer intento de secuenciación obtuvimos una mayoría de secuencias contaminantes de origen bacteriano que en algún caso llegó a representar el 90% de la muestra (datos no mostrados), impidiendo el ensamblaje del genoma del virus. Por ello, en todas las purificaciones de genomas virales posteriores, se extremaron las precauciones para evitar contaminación bacteriana: las amplificaciones al azar se realizaron utilizando cantidades superiores de genomas virales como molde y se controló el nivel de contaminación mediante PCR del gen del ARN ribosómico 16S (Figura MM1). El análisis informático mostró que entre un 46,9% y un 91,4% de las secuencias pudieron ser clasificadas como virales, hasta un 38,3% tenían un origen bacteriano, aproximadamente un 10% de las lecturas eran desconocidas y menos de un 1% tenían origen eucariótico. La secuenciación del genoma de ECTV-MouKre se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Andreas Nitsche con un protocolo distinto y presentaba un porcentaje de ADN eucariótico y desconocido muy superior al resto de las muestras (12% y 33,6% respectivamente).

Tabla R1. Lecturas obtenidas por pirosecuenciación, su clasificación taxonómica y ensamblaje con Newbler.

Aislado	Lecturas obtenidas	Tamaño medio (bp)	Distribución taxonómica (Blastx contra nr)				Lecturas mapeadas contra ECTV	Cobertura (x)	Tamaño genoma (bp)
			Desc.	Viral.	Bact.	Euc.			
Hampstead*	96.434	365	9.570 (9,9%)	66.503 (68,9%)	17.390 (18,0%)	872 (0,9%)	69.503 (72,0%)	127	206.771
Hampstead Egg*	240.573	370	20.907 (8,7%)	208.047 (86,5%)	8.368 (3,5%)	304 (0,1%)	218.157 (90,7%)	404	206.745
Ishibashi ^{*/**}	25.360	396	2.834 (11,2%)	16.807 (66,3%)	5.288 (20,8%)	44 (0,2%)	17.411 (68,6%)	32	207.479
Mill Hill**	120.182	387	8.226 (6,8%)	109.881 (91,4%)	5 (0,004%)	48 (0,04%)	117.070 (97,4%)	224	207.108
MP1**	79.430	396	4.786 (6%)	67.442 (84,9%)	5.202 (6,5%)	98 (0,1%)	69.600 (87,6%)	137	206.842
MP4**	77.287	385	5.016 (6,5%)	69.283 (89,6%)	1.115 (1,4%)	45 (0,06%)	71.527 (92,5%)	138	207.700
MP5 ^{*/**}	46.469	393	3.127 (6,7%)	39.774 (85,6%)	2.164 (4,6%)	232 (0,5%)	41.334 (88,9%)	79	207.348
MouKre	112.670	302	37.847 (33,6%)	54.964 (48,8%)	4.161 (3,7%)	13.569 (12%)	57.779 (51,3%)	88	209.592
Cornell**	67.965	384	5.137 (7,5%)	56.890 (83,7%)	4.332 (6,4%)	203 (0,3%)	58.558 (86,1%)	115	204.499
Naval*	92.155	360	10.865 (11,8%)	43.222 (46,9%)	35.381 (38,3%)	198 (0,2%)	45.195 (49,0%)	83	204.099

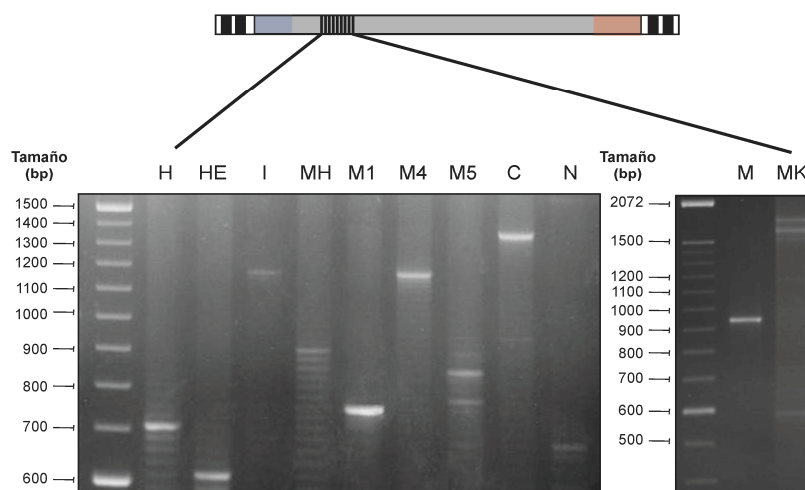
Se muestra el número y porcentaje de secuencias clasificadas taxonómicamente por blastx contra la base de datos de proteínas nr del Genbank o mapeadas en el genoma de ECTV Moscow y Naval usando Newbler. Se indican las muestras secuenciadas en Lifesequencing SL (*), en el Parque Científico de Madrid (**) y en colaboración con A Nietsche (***). Desc: Desconocidas; Viral: Virales; Bact: Bacterianas; Euc: Eucarióticas.

Las secuencias se ensamblaron *de novo* y se mapearon contra los genomas de ECTV-Moscow o ECTV-Naval agrupándose en 2 *contigs* de aproximadamente 35 Kbp y 163 Kbp separados por un número desconocido de repeticiones de 24 nucleótidos (posición 39.026 del genoma de ECTV-Moscow). El primer *contig* incluía la región repetida terminal ITR-5' con el doble de cobertura, mientras el segundo no incluía el ITR-3'. Estos contigs, unidos por un número arbitrario de repeticiones, presentaban el tamaño típico de los genomas de ECTV (204-208 Kbp) excluyendo unas 2 Kbp de las repeticiones DRI y DRII, cuyo número no pudo ser determinado. Por último, todos los aislados presentan también un contenido alto en A+T (66,6-66,8%), característico de los OPVs. La cobertura oscilaba entre 32 x en caso de ECTV-Ishibashi y 404 x para ECTV-Hampstead Egg (tabla R1).

6.1.2 Estimación por PCR del tamaño de la zona repetida y corrección de homopolímeros

La zona repetida que separaba los dos *contigs* no pudo resolverse en ninguno de los aislados ni por pirosecuenciación ni por PCR y secuenciación Sanger debido al elevado número de repeticiones. Para estimar el número de estas repeticiones, el producto de una PCR que incluía esta región se separó por electroforesis en un gel de agarosa junto con un marcador con una escalera de bandas de 100 pb. Como se muestra en la Figura R2, cada aislado presenta un número diferente de repeticiones de la secuencia de 24 nt: “TCTATATCCTGTACTATACCATTA” que varía de las 15 en el genoma de ECTV-Hampstead Egg a 63 en el aislado de ratón de campo ECTV-MouKre. Teniendo en cuenta el número de estas repeticiones hemos corregido el tamaño de los genomas de ECTV-Naval y ECTV-Moscow de 207.620 bp y 209.771 bp a 207.428 bp y 209.723 bp respectivamente (El genoma de ECTV-Moscow publicado presenta 30 repeticiones, mientras que con el gel de agarosa se estimaron 28).

A



B

Aislado	Número de repeticiones	Posición en el genoma
ECTV-Moscow	28	39.026-39.745
ECTV-Hampstead	19	37.649-38.104
ECTV-Hampstead Egg	15	37.687-38.046
ECTV-Ishibashi	38	37.779-38.666
ECTV-Mill Hill	28	37.668-38.339
ECTV-MP1	21	37.681-38.184
ECTV-MP4	38	37.884-38.795
ECTV-MP5	25	37.779-38.378
ECTV-MouKre	63	38.537-40.048
ECTV-Cornell	45	35.111-36.190
ECTV-Naval	17	36.910-37.317
ERPv	7	36.553-36.720

Figura R2. Determinación del número de repeticiones de 24 bp en los genomas de ECTVs. (A) Representación esquemática del genoma de ECTV, donde se pone en evidencia la zona de repeticiones de 24 pb. Electroforesis en geles de agarosa al 2% de los productos de PCR que incluyen la región con repeticiones de 24 pb. (B) Se indica el número estimado de repeticiones y su posición en el genoma de cada aislado. H, ECTV-Hampstead; HE, ECTV-Hampstead Egg; I, ECTV-Ishibashi; MH, ECTV-Mill Hill; M1, ECTV-MP1; M4, ECTV-MP4; M5, ECTV-MP5; C, ECTV-Cornell; N, ECTV-Naval; M, ECTV-Moscow; MK, ECTV-MouKre.

Un problema reconocido de la tecnología de pirosecuenciación 454-Roche es la dificultad para resolver zonas con repeticiones de un mismo nucleótido, llamadas homopolímeros. Esta imprecisión a la hora de determinar el número correcto de nucleótidos en homopolímeros de más de 5 nucleótidos genera inserciones o deleciones que pueden alterar la pauta de lectura de los genes que los contienen,

truncándolos. Este fue el caso de 8 de los 10 genes truncados por deleciones o inserciones en homopolímeros detectados en los aislados de ECTV, como se pudo demostrar por PCR y secuenciación Sanger o por comparación con la secuencia disponible de ECTV-Naval (tabla R2).

Tabla R2. Homopolímeros secuenciados con Sanger en distintos aislados de ECTV.

Posición en el genoma de ECTV-Moscow (nt)	Gen en ECTV- Moscow	Aislados de ECTV	Homopolímero	
			454-Roche	Sanger
15.898	EVM10	Mill Hill	6xA	6xA
20.550	EVM13	MP1, MP4, MP5, Cornell, Naval	6xT	6xT
66.587	EVM52	Mill Hill	5xT	6xT
73.396	EVM59	Mill Hill, MP1, MP4, MP5, Cornell, Ishibashi, Hampstead Egg	9xT	10xT
91.876	EVM81	Mill Hill	8xT	9xT
105.668	EVM91	MP1, Ishibashi	7xA	8xA
127.056	EVM111	Mill Hill	7xA	8xA
132.201	EVM115	Mill Hill, Cornell	7xA	8xA
148.280	Región Q	Mill Hill	6xA	6xA
150.890	EVM134	MP5	6xT	7xT
165.162	EVM148	MP1	7xA	8xA

6.1.3 Secuenciación del genoma de ECTV-Naval por Illumina

Debido a la enorme cantidad de secuencias obtenidas, la tecnología de secuenciación masiva comercializada por Illumina, se está convirtiendo en un método óptimo para la re-secuenciación de genomas. En este trabajo y con el objetivo de comparar las secuencias obtenidas con Sanger, 454-Roche e Illumina hemos re-secuenciado también con esta última técnica el genoma de ECTV-Naval. Con un precio ligeramente inferior al empleado para la pirosecuenciación 454-Roche, obtuvimos 2,75 millones de secuencias de extremos apareados 2x76 bp, casi 30 veces más lecturas que con 454-Roche. La cobertura del genoma obtenido con Illumina fue de 1.770x, 20 veces superior a la obtenida por pirosecuenciación (tabla R3).

Tabla R3. Comparación de la secuenciación del genoma de ECTV-Naval mediante 454-Roche e Illumina.

Secuenciación masiva de ECTV-Naval	454-Roche	Illumina
Lecturas obtenidas	92.155	5.497.834
Tamaño medio de lectura	360	76
Cobertura del genoma (x)	83	1.770
Tamaño del genoma (bp)	204.099	207.609
Diferencias respecto a Sanger	7	0

Además, la secuencia de Illumina no presentaba ninguna diferencia con la secuencia del genoma obtenido por Sanger. Por el contrario, la secuencia obtenida por pirosecuenciación se diferenciaba en 8 posiciones, de las cuales 6 se corresponden a deleciones de 1-2 nt en homopolímeros de 5 o más A o T (tabla R4)

Tabla R4. Diferencias entre los genomas de ECTV-Naval secuenciados por pirosecuenciación y Sanger.

Posición en el genoma de ECTV-Naval (nt)	Homopolímero	
	454-Roche	Sanger
17.460	7xA	9xA
17.470	2xA	1xA
17.494	2xA	1xA
71.185	9xT	10xT
20.550	5xT	6xT
124.846	7xA	8xA
162.190	6xA	7xA
173.020	7xT	8xT

6.1.4 Comparación de la secuencia de nucleótidos de los genomas

El genoma de ECTV-Moscow fue el primer genoma de ECTV publicado y en el presente trabajo se consideró como el genoma de referencia para los análisis de comparación. En la Figura R3 se muestra el porcentaje de identidad y el número de nucleótidos distintos entre todos los genomas de ECTV, sin tener en cuenta la región de repeticiones de 24 nt y las repeticiones DRI y II en los extremos del genoma. En este tipo de análisis tampoco se incluyó el genoma de ECTV-Hampstead Egg debido a la enorme delección de cerca de 10 Kbp. La diferencia máxima de identidad de nt entre aislados no supera el 2% lo que es consistente con su clasificación como cepas del virus ECTV (Figura R3, panel A). Los genomas de ECTV-Naval y ECTV-Cornell fueron los más diferentes con respecto al resto de los genomas de los aislados, pero a la vez los más similares entre sí al diferenciarse en tan sólo 4 nt (Figura R3, panel B). Estas 4 posiciones distintas se corresponden con dos cambios en regiones intergénicas y dos cambios sinónimos lo que hace que estos dos virus presenten un contenido proteico idéntico (tabla R5). El genoma de ERPV comparado con los genomas de ECTV-Naval y ECTV-Cornell tiene 30 nt distintos que afectan a varios genes (tabla R5).

Tabla R5. Diferencias entre los genomas de ECTV-Naval, ECTV-Cornell y ERPV.

Posición en el genoma de ECTV-Naval (nt)	Gen o pseudogen en ECTV-Naval	ECTV-Naval	ECTV-Cornell	ERPV	Tipo de cambio en la proteína
36.910-37.317	EVN041	17x24pb	45x24pb	7x24pb	Número variable de "DIDNGIVQ"
55.612-55.613	EVN062	-	-	AT	Delección 10 aa al N-terminal
130.142	EVN081	T	T	C	V66A
127.552/125.616	EVN131	A/T	A/T	G/C	R236G/V881A
152.911	EVN160	T	C	C	-
155.375	EVN162P	11xC	9xC	7xC	-
158.361	EVN165	G	T	G	-
159.104	EVN166P	5xA	5xA	6xA	-
159.383	EVN167	T	T	C	S67P
167.577	EVN176	A	A	G	N358D
168.661	EVN177	T	T	G	Y139D
189.833	EVN196	A	A	G	M241V

El genoma del aislado ECTV-Hampstead es el más parecido entre todos los aislados secuenciados al genoma de referencia ECTV-Moscow, diferenciándose en sólo 30 nt en 9 posiciones (Tabla R6). Sólo 3 de estos cambios alteran la secuencia de aminoácidos de proteínas. Desde un punto de vista evolutivo, resulta interesante que los genomas de ECTV-Hampstead Egg, ECTV-Ishibashi y ECTV-Mill Hill son idénticos a Hampstead en estas 9 posiciones.

Tabla R6. Diferencias entre los genomas de ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead.

ECTV-Moscow				ECTV-Hampstead	Tipo de cambio en la proteína
Posición en el genoma	Gen o pseudogen	nt publicado	nt resecuenciado		
13.526	EVM008	A	A	G	V164A
39.775	EVM025	A	C	C	Error de secuenciación
41.907	EVM028	T	T	C	I258V
59.134	Intergénica	ATAAGATAAG	-	-	-
102.467	EVM089	T	A	A	Error de secuenciación
147.842	Pseudogen	T	-	G	Stop183G
157.777	Pseudogen	21xC	-	10xC	-
189.000	Pseudogen	-	-	TAT	-
191.424	Pseudogen	-	-	AT	-
195.294	Pseudogen	G	-	T	-

También es interesante observar que el virus más cercano desde un punto de vista genético con el aislado de campo MouKre fue MP5 (con 285 diferencias), aproximadamente la mitad de diferencias que las que presenta con respecto al resto de virus de origen centroeuropeo (Figura R3, panel B).

La distribución de todas estas diferencias entre aislados a lo largo del genoma de ECTV se muestra con un alineamiento de cada genoma de ECTV frente al genoma de referencia ECTV-Moscow (Figura R3, panel C). Se puede observar que la región central del genoma presenta un mayor grado de conservación entre todos los aislados y que la mayoría de las diferencias se acumulan en los extremos del genoma. El bajo grado de identidad entre el genoma de ECTV-Moscow y el genoma de CPXV-Brighton Red (CPXV-BR) contrasta con la alta similitud de secuencia entre todos los aislados de ECTV.

Los aislados obtenidos de brotes en regiones geográficamente cercanas: ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5 y ECTV-Moukre, al igual que los genomas de los virus atenuados obtenidos tras numerosos pases en cultivos: ECTV-Hampstead Egg, ECTV-Ishibashi y ECTV-Mill Hill presentaron numerosos cambios en común con respecto al genoma de ECTV-Moscow (Figura R3, panel C), lo que sugiere un origen evolutivo común.

Los genomas de ECTV-Naval y ECTV-Cornell presentaban amplias regiones de similitud inferior al 98% con ECTV-Moscow, lo que obedece a delecciones de 614 y 2.217 bp en posiciones 4.621-5.237 y 7.321-9.538, respectivamente, del genoma de ECTV-Moscow (Figura R3, panel C). En la primera zona, los genomas de ECTV-Naval y ECTV-Cornell han perdido 367 nt y los 247 nt restantes presentan baja identidad con la secuencia de ECTV-Moscow.

A

Porcentaje de identidad	ECTV-Moscow	ECTV-Hampstead	ECTV-Ishibashi	ECTV-Mill Hill	ECTV-MP1	ECTV-MP4	ECTV-MP5	ECTV-MouKre	ECTV-Cornell	ECTV-Naval
ECTV-Moscow		99.9	99.9	99.8	99.9	99.9	99.8	99.7	98.2	98.2
ECTV-Hampstead	99.9		99.9	99.8	99.9	99.9	99.8	99.7	98.2	98.2
ECTV-Ishibashi	99.9	99.9		99.7	99.9	99.9	99.8	99.7	98.2	98.1
ECTV-Mill Hill	99.8	99.8	99.7		99.8	99.8	99.7	99.6	98.0	98.1
ECTV-MP1	99.9	99.9	99.9	99.8		99.9	99.8	99.7	98.1	98.1
ECTV-MP4	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9		99.8	99.7	98.1	98.1
ECTV-MP5	99.8	99.8	99.8	99.7	99.8	99.8		99.9	98.1	98.0
ECTV-MouKre	99.7	99.7	99.7	99.6	99.7	99.7	99.9		98.0	98.0
ECTV-Cornell	98.2	98.2	98.2	98.1	98.1	98.1	98.1	98.0		99.9
ECTV-Naval	98.2	98.2	98.1	98.0	98.1	98.1	98.0	98.0	99.9	

B

Diferencias en nucleótido	ECTV-Moscow	ECTV-Hampstead	ECTV-Ishibashi	ECTV-Mill Hill	ECTV-MP1	ECTV-MP4	ECTV-MP5	ECTV-MouKre	ECTV-Cornell	ECTV-Naval
ECTV-Moscow		30	167	361	148	186	362	589	3691	3689
ECTV-Hampstead	30		138	331	138	156	353	559	3683	3683
ECTV-Ishibashi	167	138		437	258	274	473	689	3797	3799
ECTV-Mill Hill	361	331	437		352	348	531	732	3928	3930
ECTV-MP1	148	138	258	352		130	297	527	3764	3766
ECTV-MP4	186	156	274	348	130		363	565	3804	3804
ECTV-MP5	362	353	473	531	297	363		285	3981	3983
ECTV-MouKre	589	559	689	732	527	565	285		4181	4183
ECTV-Cornell	3691	3683	3797	3928	3764	3804	3981	4181		4
ECTV-Naval	3689	3683	3799	3930	3766	3804	3983	4183	4	

C

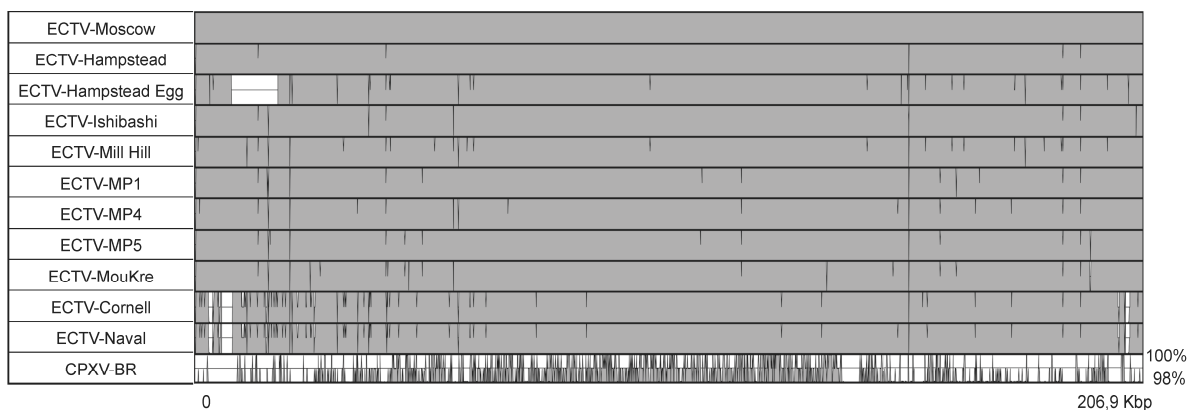
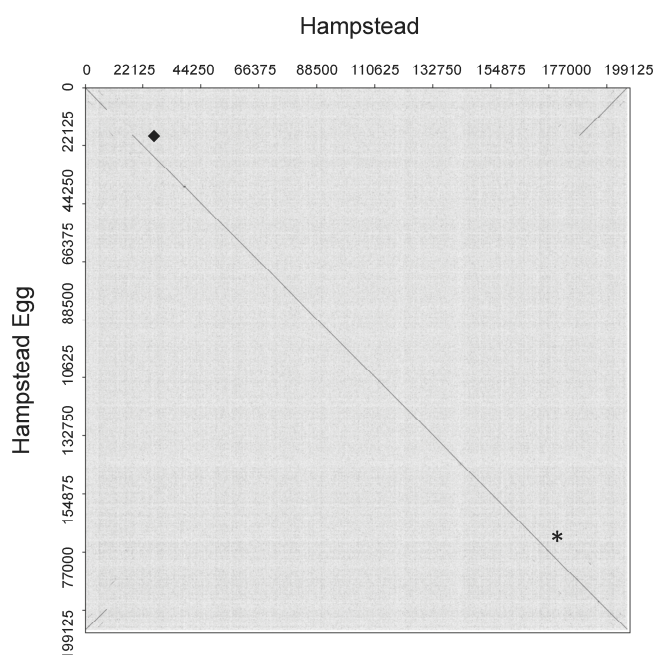


Figura R3. Comparación de la secuencia de nucleótidos de 11 genomas de ECTV. Se muestra el porcentaje de identidad (A) y el número de nucleótidos diferentes (B) entre todos los aislados. (C) Alineamiento de los genomas de ECTV y de CPXV-BR frente al aislado ECTV-Moscow (*smooth plot*). Se representa el % de identidad por ventanas de 100 bp a lo largo del genoma. Las líneas verticales representan ventanas con identidades menores o iguales al 98% y del 99%. M, ECTV-Moscow; H, ECTV-Hampstead; HE, ECTV-Hampstead Egg; I, ECTV-Ishibashi; MH, ECTV-Mill Hill; M1, ECTV-MP1; M4, ECTV-MP4; M5, ECTV-MP5; MK, ECTV-MouKre; C, ECTV-Cornell; N, ECTV-Naval; BR, CPXV-BR.

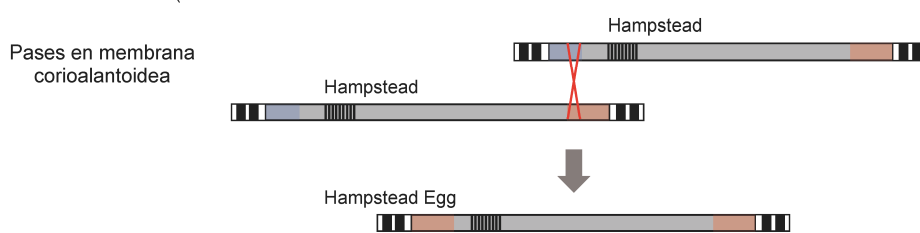
En la representación del genoma de ECTV-Hampstead Egg también se encontró una zona de ausencia de similitud muy amplia, del orden de 10 Kbp en el extremo 5' del genoma (Figura R3, panel C). La ausencia de similitud en esta zona sin embargo, no es debido a una delección, como en el caso de las zonas de ECTV-Naval y ECTV-Cornell, sino a una reorganización del genoma como consecuencia de una sustitución del extremo 5' del genoma por una copia del extremo 3' (Figura R4, paneles A y B) ocurrida durante los pases sucesivos del virus en CAMs. Esta explicación se sustenta en varias secuencias que hemos encontrado formadas por los últimos nucleótidos de la región repetida terminal, seguidas por secuencias centrales únicas pero con alta similitud en posiciones 18.147 y 188.886

(asterisco y rombo en la Figura R4c). Esta reorganización tiene como consecuencia la duplicación de 3 genes adicionales en el extremo 5' del genoma y la pérdida de cerca de 10 Kbp que incluyen 6 genes inmunomoduladores o con función desconocida.

A



B



C



Figura R4. Comparación de los genomas de ECTV-Hampstead y ECTV-Hampstead Egg. (A) Representación de la colinealidad (*dot plot*) entre los genomas. (B) Esquema del proceso de recombinación ocurrido en el genoma de ECTV-Hampstead durante los pases en CAMs. (C) Alineamiento de dos lecturas que comparten el final de la secuencia repetida terminal y difieren en el principio de la zona central única.

6.1.5 Relaciones filogenéticas

El análisis filogenético basado en la región central conservada del genoma (65 Kbp), confirma que los aislados secuenciados son cepas de ECTV claramente diferentes de otros miembros del género OPV como CPXV, MPXV y VARV (Figura R5, panel A). Además, como se puede ver el panel B de la Figura R5, este análisis ha revelado la existencia de dos clados que hasta ahora no se habían definido. El primero se ha denominado el clado europeo (Figura R5, panel B, sombra azul), ya que está formado por los aislados procedentes de Europa o derivados de ellos: ECTV-Hampstead, ECTV-Hampstead Egg, ECTV-Moscow, ECTV-Mill Hill, ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5 y ECTV-MouKre, y por el aislado Japonés ECTV-Ishibashi. El segundo se ha denominado clado asiático y está formado por los aislados

ERPV, ECTV-Naval, y ECTV-Cornell (Figura R5, panel B, sombra roja). Pese a que estos dos últimos virus se aislaron en animalarios de Estados Unidos, el brote causado por ECTV Cornell tiene su origen en un suero de ratones contaminado procedente de China (Lipman NS et al 2000). Además, ECTV-Naval comparte un 99,8% de identidad de nucleótidos con ERPV procedente de China (Mendez-Rios JD et al 2011). Los ECTV-MPs están claramente emparentados con ECTV-MouKre formando un subclado (Figura R5, panel B, sombra verde) dentro del clado europeo, lo cual resulta coherente puesto que todos ellos proceden de la misma región geográfica. De nuevo este análisis filogenético sitúa a MP5 como el aislado más próximo evolutivamente al aislado de campo ECTV-MouKre.

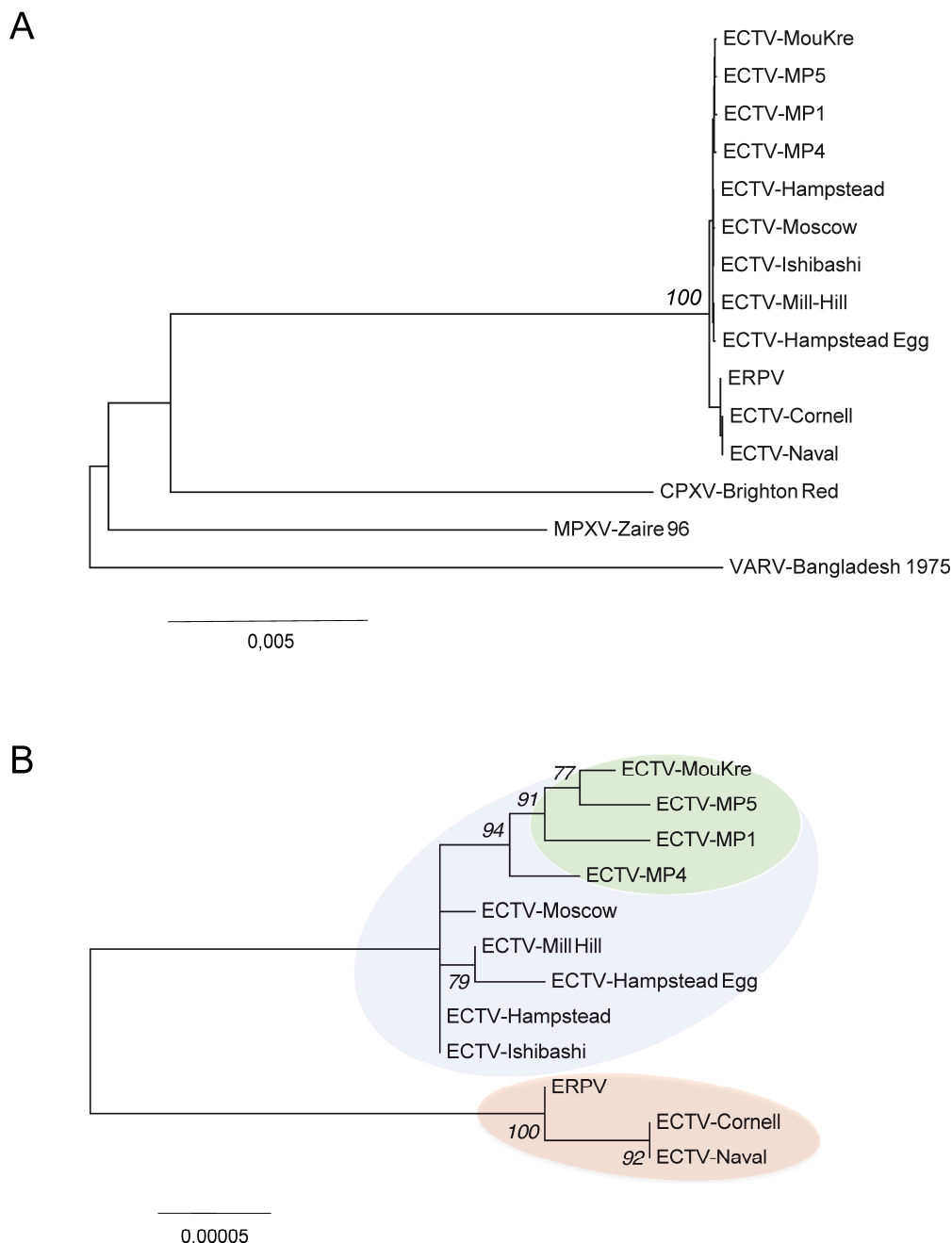


Figura R5. Análisis filogenéticos de los aislados de ECTV con el método NJ y bootstrap 10³. (A) Se muestra la relación filogenética con otros representantes del género OPVs: CPXV-BR, MPXV-Zaire 96 y VARV-BSH; (B) o entre los 12 aislados conocidos de ECTV. Los clados europeo y asiático se indican con un sombreados naranja y azul, respectivamente, y en color verde se indica el subclado centroeuropeo.

6.2 Actualización de la anotación del genoma de ECTV-Naval

El genoma de ECTV-Naval se secuenció por nuestro grupo utilizando el método de Sanger y su secuencia se depositó en la base de datos www.poxvirus.org en el año 2003. Desde entonces, la información publicada relativa a los genes de los poxvirus ha aumentado considerablemente.

En el presente trabajo, se han reanotado los genes de ECTV-Naval, virus prototipo de nuestro laboratorio, con el objetivo de tener una referencia actualizada de sus genes y de sus funciones para su posterior comparación con otros aislados de ECTV. En esta nueva anotación, los genes se nombraron con la abreviatura EVN y un número correlativo del 1 al 206 (tabla R7). A diferencia de la anotación de los genomas de ECTV-Moscow y ERPV, en las que se designaron los pseudogenes como regiones o fragmentos con nomenclatura distinta a los genes codificantes, en la anotación de ECTV-Naval a los pseudogenes se les asignó un número como a los genes, y esto se mantuvo en la reanotación de ECTV-Naval. Esto se hizo para facilitar la reasignación de pseudogenes como genes en caso de demostrarse su funcionalidad posteriormente. Para señalar su naturaleza distinta, se les añadió detrás de la abreviatura y del número, una P de pseudogen aunque el número total de ORFs anotadas no ha variado, en esta nueva anotación se han definido 174 genes y 32 pseudogenes, mientras que en la anterior se habían anotado 179 genes y 27 pseudogenes. Estos genes presentan generalmente más del 90% de identidad con sus ortólogos de VACV, CPXV o VARV, de los que se dispone de una mayor información acerca de su función.

En la Figura R6 se muestra un esquema del genoma de ECTV-Naval que incluye 42 genes adscritos a modulación del sistema inmune y del rango de hospedador, 53 a morfogénesis, 47 a metabolismo de ADN y ARN, y 33 genes cuya función está por definir. La organización genómica está altamente conservada, respetando la típica organización de los poxvirus. Así, en la región central se encuentran genes muy conservados que codifican para proteínas implicadas en replicación, transcripción, morfogénesis, así como proteínas estructurales del virión, mientras que en los extremos se encuentran los genes que participan en evasión del sistema inmune y rango de hospedador (Figura R6).

A continuación, se detalla el contenido génico del genoma de ECTV-Naval agrupando los genes según su función predicha o demostrada y haciendo especial énfasis en las diferencias con la anotación antigua de ECTV-Naval y con la de ECTV-Moscow y ERPV.

Resultados

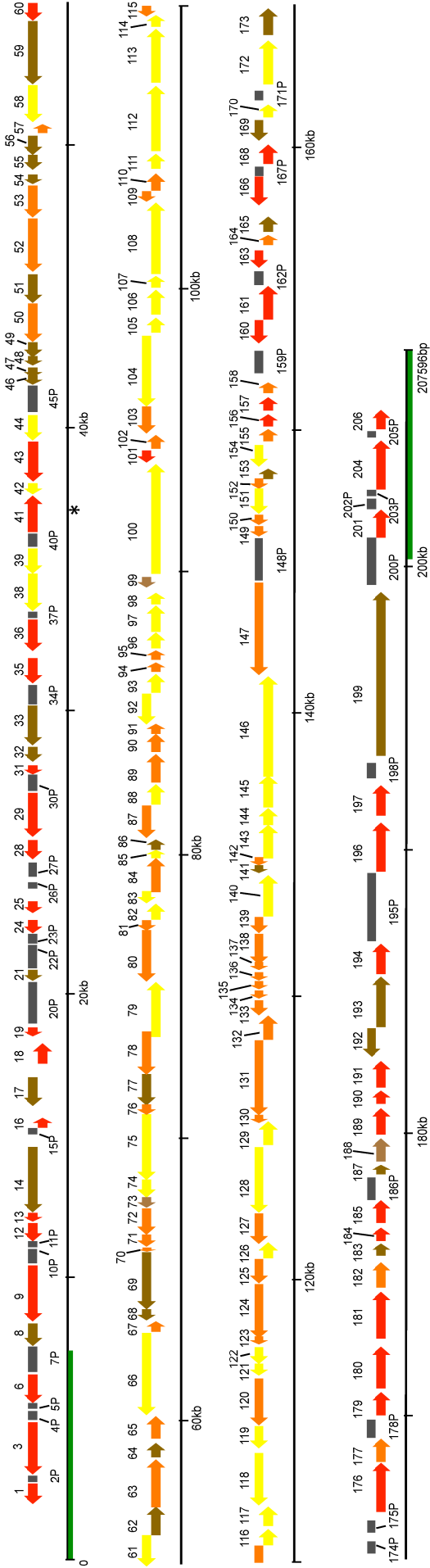


Figura R6. Organización esquemática del genoma de ECTV-Naval. La dirección de la flecha indica el sentido de transcripción del gen. Se representan las ORF's con colores distintos de acuerdo con su función: en rojo los genes que modifican la respuesta inmune o que determinan el rango de hospedador, en amarillo los genes implicados en el metabolismo de ADN y ARN, en naranja los genes estructurales, de entrada en la célula o de morfogénesis del virión, en marrón los genes con función desconocida y en gris los pseudogenes. La línea de color verde indica la región terminal repetida y el asterisco la zona con repeticiones de 24 nt.

Tabla R7. Nueva anotación del genoma de ECTV-Naval					Genes ortólogos en:			
Genes en ECTV-Naval								
Gen	Posición (bp)	bp	aa*	Nombre/Función/Características	ECTV-Moscow	VACV-Cop	CPXV-BR	VARV-BSH
EVN001	2.035-2.775	741	247	35k, vCKBP, secretada	EVM001	C23L	CPXV003	G3R
EVN003	3.108-4.868	1761	587	Modulación maquinaria ubiquitinación, proteína tipo anquirina	EVM002	C21L	CPXV006	G1R
EVN006	5.580-6.539	960	320	CrnD, receptor del TNF y dominio SECRET, secretado	EVM003		CPXV221	
EVN008	7.518-8.339	822	273	Proteína tipo kelch	EVM004		GRI D7L	
EVN009	8.458-10.410	1953	650	Modulación maquinaria ubiquitinación, proteína tipo anquirina	EVM005		CPXV011	
EVN012	11.256-11.864	609	202	Dominio SECRET, secretado	EVM008		CPXV005	
EVN013	11.861-12.196	336	111	Homólogo a CD30, secretado	EVM009		CPXV015	
EVN014	12.287-14.578	2292	763	Proteína tipo anquirina	EVM010	B18R	CPXV016	
EVN016	15.451-15.699	249	83	Factor de crecimiento viral, secretado	EVM010.5	C11R	CPXV021	D4R
EVN017	16.016-17.011	996	331		EVM011	C10L	CPXV022	D5L
EVN018	17.522-18.250	729	242	E3, ubiquitina ligasa, dedo de zinc	EVM012		CPXV023	D6R
EVN019	18.401-18.781	381	126	Proteína de unión a IL-18, secretada	EVM013		CPXV024	D7L
EVN021	20.471-20.686	216	72		EVM014	WR C14L	CPXV026	
EVN024	22.126-22.578	453	150	Rango de hospedador, tipo anquirina	EVM015	C7L	CPXV029	D11L

Genes en ECTV-Naval				Genes ortólogos en:				
Gen	Posición (bp)	pb	aa*	Nombre/Función/Características	ECTV-Moscow	VACV-Cop	CPXV-BR	VARV-BSH
EVN025	22.806-23.273	468	155		EVM016	C6L	CPXV030	D12L
EVN028	24.659-25.447	789	262	Proteína de unión al complemento, secretada	EVM017	C3L	CPXV034	D15L
EVN029	25.503-27.041	1539	512	Proteína tipo kelch, factor de virulencia	EVM018	C2L	CPXV035	D16L
EVN031	27.728-28.081	354	117	Factor de inhibición de apoptosis y activación de NF-κB	EVM019	N1L	CPXV037	P1L
EVN032	28.210-28.743	534	177	Proteína sensible a alfa-amanitine	EVM020	N2L	CPXV038	N2L
EVN033	28.776-30.194	1419	472	Proteína tipo anquirina	EVM021	M1L	CPXV039	O1L
EVN035	30.981-31.838	858	285	Rango de hospedador, proteína tipo anquirina	EVM022	K1L	CPXV041	O3L/C1L
EVN036	32.063-33.184	1122	373	SPI-3, inhibidor de serina proteasa	EVM023	K2L	CPXV042	K3L
EVN038	33.525-34.799	1275	424	ADNasa, función de corte y unión, proteína tipo fosfolipasa D	Región N	K4L	CPXV044	
EVN039	34.821-35.651	831	176	Proteína tipo lisofosfolipasa	EVM024	K5L	CPXV045	
EVN041	36.300-37.577	1278	425	Inhibidor de la caspasa 9, familia Bcl-2	EVM025	F1L	CPXV048	C5L
EVN042	37.577-38.020	444	147	Deoxiuridina trifosfatasa	EVM026	F2L	CPXV049	C6L
EVN043	38.056-39.501	1446	481	Proteína tipo kelch, factor de virulencia	EVM027	F3L	CPXV050	C7L
EVN044	39.512-40.471	960	319	Ribonucleótido reductasa, subunidad pequeña	EVM028	F4L	CPXV051	C8L
EVN046	41.504-41.719	216	72		EVM029	F6L	CPXV053	C10L
EVN047	41.737-41.976	240	80		EVM030	F7L	CPXV054	C11L
EVN048	42.127-42.321	195	65		EVM031	F8L	CPXV055	C12L
EVN049	42.379-43.017	639	212	Proteína de membrana	EVM032	F9L	CPXV056	C13L
EVN050	43.004-44.323	1320	439	Serina treonina quinasa	EVM033	F10L	CPXV057	C14L
EVN051	44.346-45.410	1065	354		EVM034	F11L	CPXV059	C15L
EVN052	45.469-47.373	1905	634	Maduración de EEV	EVM035	F12L	CPXV060	C16L
EVN053	47.406-48.524	1119	372	P37, proteína mayor de la envuelta (EEV), proteína tipo fosfolipasa D	EVM036	F13L	CPXV061	C17L
EVN054	48.545-48.757	213	71		EVM037	F14L	CPXV062	C18L
EVN055	49.022-49.498	477	158		EVM038	F15L	CPXV064	C19L
EVN056	49.505-50.200	696	231		EVM039	F16L	CPXV065	C20L
EVN057	50.262-50.567	306	101	VP11, proteína estructural (IMV)	EVM040	F17R	CPXV066	C21R
EVN058	50.564-52.003	1440	479	Poly A polimerasa, subunidad grande	EVM041	E1L	CPXV067	E1L
EVN059	52.000-54.213	2214	737		EVM042	E2L	CPXV068	E2L
EVN060	54.319-54.891	573	190	Factor de resistencia a IFN	EVM043	E3L	CPXV069	E3L
EVN061	54.947-55.726	780	259	ARN polimerasa, subunidad 30kDa	EVM044	E4L	CPXV070	E4L
EVN062	55.775-56.800	1026	341		EVM045	E5R	CPXV071	E5R
EVN063	56.997-58.700	1704	567	Proteína implicada en morfogénesis	EVM046	E6R	CPXV072	E6R
EVN064	58.781-59.278	498	165		EVM047	E7R	CPXV073	
EVN065	59.406-60.227	822	273	Proteína de membrana, implicada en la transcripción y morfogénesis	EVM048	E8R	CPXV074	E8R
EVN066	60.234-63.254	3021	1006	ADN polimerasa	EVM049	E9L	CPXV075	E9L
EVN067	63.286-63.570	285	95	Proteína de membrana de la ruta de formación de puentes disulfuro, implicada en morfogénesis	EVM050	E10R	CPXV076	E10R
EVN068	63.568-63.957	390	129		EVM051	E11L	CPXV077	E11L
EVN069	63.944-65.944	2001	666	Proteína de membrana	EVM052	O1L	CPXV078	Q1L
EVN070	65.988-66.314	327	108	Homólogo de la glutaredoxina	EVM053	O2L	CPXV079	Q2L
EVN071	66.149-66.253	105	35	Entrada en la célula	-	O3L	-	-
EVN072	66.458-67.396	939	312	Unión a ADN, estadio tardío de morfogénesis del virión	EVM054	I1L	CPXV080	K1L
EVN073	67.406-67.624	219	73		EVM055	I2L	CPXV081	K2L
EVN074	67.625-68.434	810	269	Fosfoproteína de unión a ADNcs	EVM056	I3L	CPXV082	K3L
EVN075	68.517-70.832	2316	771	Ribonucleótido reductasa, subunidad grande	EVM057	I4L	CPXV083	K4L

Resultados

Genes en ECTV-Naval				Genes ortólogos en:				
Gen	Posición (bp)	pb	aa*	Nombre/Función/Características	ECTV-Moscow	VACV-Cop	CPXV-BR	VARV-BSH
EVN076	70.862-71.098	237	79	Proteína estructural, membrana del virión (IMV)	EVM058	I5L	CPXV084	K5L
EVN077	71.117-72.265	1149	382		EVM059	I6L	CPXV085	K6L
EVN078	72.258-73.529	1272	423		EVM060	I7L	CPXV086	K7L
EVN079	73.535-75.565	2031	676		EVM061	I8R	CPXV087	K8R
EVN080	75.568-77.343	1776	591	Proteína de la envuelta del virión (IMV), metaloproteasa	EVM062	G1L	CPXV088	H1L
EVN081	77.340-77.675	336	111	Entrada en la célula	EVM063	G3L	CPXV089	H3L
EVN082	77.669-78.331	663	220	VL TF, factor de transcripción tardío viral	EVM064	G2R	CPXV090	H2R
EVN083	78.301-78.675	375	124	Homólogo de la glutaredoxina 2	EVM065	G4L	CPXV091	H4L
EVN084	78.678-79.982	1305	434	Proteína implicada en morfogénesis	EVM066	G5R	CPXV092	H5R
EVN085	79.990-80.178	189	63	ARN polimerasa, subunidad 7kDa	EVM067	G5.5R	CPXV093	H5.5R
EVN086	80.183-80.680	498	165		EVM068	G6R	CPXV094	H6R
EVN087	80.645-81.760	1116	371	Proteína estructural (IMV)	EVM069	G7L	CPXV095	H7L
EVN088	81.791-82.573	783	260	VL TF-1, factor de activación tardío viral	EVM070	G8R	CPXV096	H8R
EVN089	82.593-83.615	1023	340	Complejo de fusión-entrada, proteína miristilada	EVM071	G9R	CPXV097	H9R
EVN090	83.616-84.368	753	250	Proteína estructural 25 kDa del virión (IMV)	EVM072	L1R	CPXV098	M1R
EVN091	84.400-84.660	261	87	Proteína implicada en morfogénesis	EVM073	L2R	CPXV099	M2R
EVN092	84.653-85.693	1041	346	Factor de activación temprano	EVM074	L3L	CPXV100	M3L
EVN093	85.718-86.473	756	251	Proteína de unión a ADN/ARN	EVM075	L4R	CPXV101	M4R
EVN094	86.483-86.869	387	128	Entrada en la célula	EVM076	L5R	CPXV102	M5R
EVN095	86.826-87.287	462	153	Proteína estructural (IMV)	EVM077	J1R	CPXV103	L1R
EVN096	87.303-87.836	534	177	Timidina quinasa	EVM078	J2R	CPXV104	L2R
EVN097	87.901-88.902	1002	333	Vp39, políA polimerasa, subunidad pequeña, multifuncional	EVM079	J3R	CPXV105	L3R
EVN098	88.817-89.374	558	185	Rpo22, ARN polimerasa, subunidad de 22 kDa	EVM080	J4R	CPXV106	L4R
EVN099	89.439-89.840	402	133	Proteína de membrana	EVM081	J5L	CPXV107	L5L
EVN100	89.946-93.806	3861	1286	Rpo147, ARN polimerasa, subunidad 147 kDa	EVM082	J6R	CPXV108	L6R
EVN101	93.803-94.318	516	171	Serina/tirosina fosfatasa, evasión de la señalización mediada por IFN	EVM083	H1L	CPXV109	I1L
EVN102	94.332-94.901	570	189	Entrada en la célula	EVM084	H2R	CPXV111	I2R
EVN103	94.904-95.878	975	324	Proteína inmunodominante de la envuelta (IMV)	EVM085	H3L	CPXV112	I3L
EVN104	95.879-98.263	2385	794	RAP94, proteína asociada a la ARN-polimerasa	EVM086	H4L	CPXV113	I4L
EVN105	98.449-99.087	639	212	VL TF-4, factor de transcripción tardío viral	EVM087	H5R	CPXV114	I5R
EVN106	99.088-100.032	945	314	Topoisomerasa I del ADN	EVM088	H6R	CPXV115	I6R
EVN107	100.069-100.509	441	146	Proteína de membrana	EVM089	H7R	CPXV117	I7R
EVN108	100.551-103.082	2532	843	Enzima de capping, subunidad grande	EVM090	D1R	CPXV118	F1R
EVN109	103.041-103.481	441	146	Proteína estructural del nucleóide (IMV)	EVM091	D2L	CPXV119	F3L
EVN110	103.474-104.187	714	237	Proteína estructural del nucleóide (IMV)	EVM092	D3R	CPXV120	F2R
EVN111	104.187-104.843	657	218	Glicosilasa de ADN	EVM093	D4R	CPXV121	F4R
EVN112	104.875-107.232	2358	785	Nucleósido trifosfatasa	EVM094	D5R	CPXV122	F5R
EVN113	107.273-109.186	1914	637	Factor de transcripción temprana viral	EVM095	D6R	CPXV123	F6R
EVN114	109.213-109.698	486	161	Rpo18, ARN-polimerasa, subunidad de 18 kDa	EVM096	D7R	CPXV124	F7R
EVN115	109.661-110.575	915	304	Proteína estructural de la envuelta (IMV), implicada en unión a la célula	EVM097	D8L	CPXV125	F8L
EVN116	110.617-111.258	642	213	Proteína 25 kDa similar a mut-T, regulación niveles ARNm	EVM098	D9R	CPXV126	F9R
EVN117	111.255-112.007	753	250	Proteína 29 kDa similar a mut-T, regulación niveles ARNm	EVM099	D10R	CPXV127	F10R
EVN118	112.004-113.899	1896	631	NPHI, ADN-helicasa, nucleósido trifosfato fosfo-hidrolasa	EVM100	D11L	CPXV128	N1L
EVN119	113.933-114.796	864	287	VITF, factor de iniciación de la transcripción viral, capping	EVM101	D12L	CPXV129	N2L
EVN120	114.827-116.482	1656	551	Proteína estructural de membrana, resistencia a la rifampicina (IMV)	EVM102	D13L	CPXV131	N3L

Genes en ECTV-Naval					Genes ortólogos en:			
Gen	Posición (bp)	pb	aa*	Nombre/Función/Características	ECTV-Moscow	VACV-Cop	CPXV-BR	VARV-BSH
EVN121	116.506-116.958	453	150	VLTF-2, factor de transcripción tardío viral	EVM103	A1L	CPXV132	A1L
EVN122	116.979-117.653	675	224	VLTF-3, factor de transcripción tardío viral	EVM104	A2L	CPXV133	A2L
EVN123	117.653-117.880	228	76	Proteína de la ruta de formación de puentes disulfuro	EVM105	A2.5L	CPXV134	
EVN124	117.895-119.829	1935	644	P4b, proteína mayor del nucleóide (IMV)	EVM106	A3L	CPXV135	A4L
EVN125	119.882-120.727	846	281	Proteína estructural inmunodominante del nucleóide (IMV)	EVM107	A4L	CPXV136	A5L
EVN126	120.765-121.259	495	164	Rpo, 19Subunidad 19 kDa de la ARN-polimerasa	EVM108	A5R	CPXV137	A6R
EVN127	121.256-122.374	1119	372	Proteína implicada en morfogénesis	EVM109	A6L	CPXV138	A7L
EVN128	122.398-124.530	2133	710	VETF, factor de transcripción temprana viral, subunidad grande de 82 kDa	EVM110	A7L	CPXV139	A8L
EVN129	124.584-125.450	867	288	VITF-3, factor de transcripción intermedio viral	EVM111	A8R	CPXV140	A9R
EVN130	125.447-125.773	327	108	Factor de morfogénesis (IMV)	EVM112	A9L	CPXV141	A10L
EVN131	125.774-128.449	2676	891	4a, proteína mayor del nucleóide (IMV)	EVM113	A10L	CPXV142	A11L
EVN132	128.464-129.420	957	318	Factor de morfogénesis	EVM114	A11R	CPXV143	A12R
EVN133	129.422-129.997	576	191	Factor de morfogénesis, proteína del nucleóide (IMV)	EVM115	A12L	CPXV144	A14L
EVN134	130.024-130.221	198	66	P8, proteína estructural de membrana del nucleóide (IMV)	EVM116	A13L	CPXV145	A14L
EVN135	130.333-130.602	270	90	P16, proteína estructural de membrana (IMV)	EVM117	A14L	CPXV146	A15L
EVN136	130.622-130.780	159	53	Proteína estructural de membrana (IMV)	EVM117.5	A14.5L	CPXV147	
EVN137	130.773-131.054	282	94	Proteína implicada en morfogénesis	EVM118	A15L	CPXV148	A16L
EVN138	131.038-132.171	1134	377	Proteína miristilada 35 kDa, entrada en la célula	EVM119	A16L	CPXV149	A17L
EVN139	132.174-132.782	609	202	Proteína estructural de membrana, implicada en morfogénesis (IMV)	EVM120	A17L	CPXV150	A18L
EVN140	132.797-134.278	1482	493	Helicasa de ADN, ATPasa dependiente de ADN	EVM121	A18R	CPXV151	A19R
EVN141	134.262-134.492	231	77		EVM122	A19L	CPXV152	A20L
EVN142	134.493-134.849	357	118	Proteína de entrada a la célula	EVM123	A21L	CPXV153	A22L
EVN143	134.848-136.128	1281	426	Factor de procesividad de la ADN-polimerasa	EVM124	A20R	CPXV154	A21R
EVN144	136.058-136.621	564	187	Resolvasa de la unión de Holliday	EVM125	A22R	CPXV155	A23R
EVN145	136.641-137.789	1149	382	VITF-3, factor de transcripción intermedio viral	EVM126	A23R	CPXV156	A24R
EVN146	137.786-141.280	3495	1164	Rpo132, ARN-polimerasa, subunidad 132 kDa	EVM127	A24R	CPXV157	A25R
EVN147	141.273-144.614	3342	1113	ATIp, proteína de los ATIs	EVM128	A25L	CPXV158	A26L
EVN149	146.223-146.555	333	110	Proteína de ATIs, puente entre A25L y P4c	EVM129	A27L	CPXV162	A31L
EVN150	146.556-146.996	441	146	Proteína de entrada en la célula	EVM130	A28L	CPXV163	A31.5L
EVN151	146.997-147.914	918	305	Rpo35, ARN-polimerasa, subunidad 35 kDa	EVM131	A29L	CPXV164	A32L
EVN152	147.880-148.110	231	77	Proteína implicada en morfogénesis	EVM132	A30L	CPXV165	A33L
EVN153	148.270-148.650	381	126		EVM133	A31R	CPXV166	A24R
EVN154	148.620-149.429	810	269	ATPasa	EVM134	A32L	CPXV167	A25L
EVN155	149.547-150.104	558	185	Glicoproteína estructural de la envuelta (EEV)	EVM135	A33R	CPXV168	A26R
EVN156	150.128-150.634	507	168	Glicoproteína estructural de la envuelta tipo lectina (EEV), similar a CD69, implicada en la salida de EEV, su infectividad y virulencia	EVM136	A34R	CPXV169	A37R
EVN157	150.677-151.207	531	176	Inhibición a la expresión de MHC-II	EVM137	A35R	CPXV171	
EVN158	151.275-151.757	483	160	Factor de morfogénesis, proteína del virión (EEV)	EVM137.5	A36R	CPXV172	A38R
EVN160	153.040-153.873	834	277	Proteína similar a CD47, promueve la entrada de Ca ²⁺ extracelular	EVM138	A38L	CPXV173	A41L
EVN161	153.888-155.087	1200	399	Semaforina viral, secretada	EVM139	A39R	CPXV175	A42R/A43R
EVN163	155.709-156.380	672	223	Proteína de unión a quimiocinas, secretada	EVM140	A41L	CPXV176	A44L
EVN164	156.542-156.946	405	134	Profilina, implicada en el transporte intracelular de proteínas virales	EVM141	A42R	CPXV178	A45R
EVN165	156.986-157.621	636	211		EVM142	A43R	CPXV179	A46R
EVN166	157.923-158.963	1041	346	3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa	EVM143	A44L	CPXV180	A47L
EVN168	159.377-160.099	723	240	Inhibidor de NF-KB, similar al dominio citoplásmico del TLR/IL-1R	EVM145	A46R	CPXV184	A49R

Resultados

Genes en ECTV-Naval					Genes ortólogos en:			
Gen	Posición (bp)	pb	aa*	Nombre/Función/Características	ECTV-Moscow	VACV-Cop	CPXV-BR	VARV-BSH
EVN169	160.186-160.920	735	244		EVM146	A47L	CPXV185	J1L
EVN170	161.019-161.633	615	204	Motif A del sitio de unión a ATP/GTP	EVM147	A48R	CPXV186	J2R
EVN172	162.206-163.870	1665	554	ADN ligasa	EVM148	A50R	CPXV188	J4R
EVN173	163.923-164.927	1005	334		EVM149	A51R	CPXV189	J5R
EVN176	166.698-168.389	1692	563	Modulación maquinaria ubiquitinación, proteína tipo kelch	EVM150	A55R	CPXV193	J6R
EVN177	168.439-169.284	846	281	Hemaglutinina viral	EVM151	A56R	CPXV194	J7R
EVN179	170.052-170.951	900	299	Serín-treonin quinasa 30 kDa	EVM152	B1R	CPXV196	B1R
EVN180	171.018-172.529	1512	503	Homologo a Schlafen	EVM153		CPXV197	
EVN181	172.766-174.460	1695	564	Modulación maquinaria ubiquitinación, proteína tipo anquirina	EVM154	B4R	CPXV198	B5R
EVN182	174.547-175.500	954	317	Glicoproteína estructural del la envuelta (EEV)	EVM155	B5R	CPXV199	B6R
EVN183	175.659-176.192	534	177		EVM156	B6R	CPXV200	B7R
EVN184	176.231-176.776	546	181	Dominio SECRET secretado	EVM157	B7R	CPXV201	
EVN185	176.831-177.631	801	266	Receptor de IFN-γ, secretado	EVM158	B8R	CPXV202	B8R
EVN187	178.663-178.926	264	87	Serina-treonina quinasa	EVM159	B11R	CPXV205	
EVN188	178.992-179.852	861	286	Serina-treonina quinasa	EVM160	B12R	CPXV206	B11R
EVN189	179.944-180.978	1035	344	SPI-2, inhibidor de serina proteasa	EVM161	B14R	CPXV207	B12R
EVN190	181.057-181.551	495	164		EVM162	B15R	CPXV208	B13R
EVN191	181.638-182.624	987	328	Receptor de IL-1-β, secretado	EVM163	B16R	CPXV209	
EVN192	182.679-183.701	1023	340		EVM164	B17L	CPXV210	B17L
EVN193	183.791-185.575	1785	594	Proteína tipo anquirina	EVM165	B18R	CPXV211	B16R
EVN194	185.636-186.712	1077	358	Proteína de unión a IFN-α/β, secretada	EVM166	B19R	CPXV212	B17R
EVN196	189.305-190.984	1680	559	P65, modulación maquinaria ubiquitinación, proteína tipo kelch	EVM167	A55R	CPXV215	J6R
EVN197	191.243-192.355	1113	370	SPI-1, inhibidor de serina proteasa	EVM168	C12L	CPXV217	B21R
EVN199	193.346-199.120	5775	1924	Proteína de membrana	EVM169		CPXV219	B22R
EVN201	201.082-202.044	963	320	CrmD, Receptor del TNF y dominio SECRET, secretado	EVM170		CPXV221	
EVN204	202.753-204.516	1764	587	Proteína tipo anquirina	EVM171	B27R	CPXV225	G1R
EVN206	204.846-205.589	744	247	35k, vCKBP, secretada	EVM172	B29R		G3R

(*) = numero de aminoácidos.

(*) = numero de aminoácidos.

6.2.1 Genes implicados en replicación, transcripción y morfogénesis

Una de las características que distingue a los poxvirus de otros virus de ADN es que el ciclo replicativo del virus se desarrolla íntegramente en el compartimento citoplasmático de la célula infectada (Moss, 2007). Para ello, los poxvirus han desarrollado una batería de genes que les permite un alto nivel de independencia de la maquinaria celular del hospedador a nivel de replicación, transcripción o modificación de proteínas. La mayoría de estos genes forman parte de los 90 genes altamente conservados entre los ChPVs definidos como genes del *core* (Tabla R9) (Lefkowitz et al., 2006).

6.2.1.1 Genes de replicación del ADN y de transcripción

Además de codificar por su propia ADN polimerasa viral (EVN066) y su factor de procesividad (EVN143), ECTV-Naval contiene el gen EVN038 que aunque no está definido como gen del *core* (Lefkowitz et al., 2006), codifica para una ADNasa de 424 aa. Este gen es 100% idéntico a su homólogo en ERPV, mientras que en el genoma de ECTV-Moscow se encuentra anotado como pseudogen (Región N) porque codifica para una proteína truncada de 372 aa (tabla R7).

La ARN polimerasa y los factores de transcripción se encuentran altamente conservados en la mayoría de los poxvirus (Moss, 2007). Al igual que VACV, ECTV codifica para una ARN polimerasa propia con una masa molecular de 500 kDa que consta de nueve subunidades (tabla R7, R9) y también para factores de transcripción y de terminación tempranos, intermedios y tardíos (tabla R7, R9).

6.2.1.2 Proteínas implicadas en la entrada del virus en la célula

En el genoma de ECTV-Naval se encuentran los 14 genes esenciales y conservados que forman el complejo de fusión a la membrana y entrada en la célula (EFC) (tabla R9). Recientemente se ha descrito un nuevo gen de VACV-Cop, O3L, que codifica para una proteína de 35 aa que participa en la formación del EFC. Este gen no se encuentra en la anotación de ECTV-Moscow, pero en ECTV-Naval se ha identificado como EVN071.

En VACV-Cop se han descrito cuatro genes que codifican para proteínas implicadas en la unión del virión a la célula: H3L, D8L, A27L y A26L. En el genoma de ECTV-Naval los tres primeros se corresponden respectivamente con EVN103, EVN115 y EVN149. El ortólogo del último se encuentra truncado en el genoma de ECTV-Naval y por lo tanto se ha clasificado como el pseudogen EVN148P (tabla R8). De este grupo de genes con función parecida, solo H3L se encuentra altamente conservado dentro de los ChPVs.

6.2.1.3 Genes implicados en procesos de morfogénesis

El genoma de ECTV-Naval también alberga un gran número de genes que codifican para enzimas involucradas en la modificación de proteínas del virión en el citoplasma de la célula infectada. Los genes EVN067, EVN83 y EVN123 codifican para proteínas con actividad redox y permiten la formación de puentes disulfuro en las proteínas de membrana de los IMV en el citoplasma de las células infectadas, EVN078 codificada por una cisteína-proteasa y EVN050 y EVN179 codifican por quinasas (tabla R9).

Otros genes de ECTV-Naval importantes en la morfogénesis del virión son EVN053, EVN155, EVN156, EVN158, EVN177, EVN182. Estos genes codifican para glicoproteínas presentes en la

membrana de los IEV e IMV y regulan los movimientos intracelulares de los viriones durante el proceso de salida de la célula. El gen EVN158 codifica para una proteína de 160 aa. Su homóloga en VACV-Cop (A36) de 221 aa resulta esencial para el movimiento de los IEV a través de los microtúbulos y para la formación de las colas de actina que se generan durante la liberación de los EEV. A pesar de haber perdido un gran fragmento en el extremo C-terminal, la proteína de ECTV-Naval conserva los primeros 100 residuos, indispensables para la motilidad mediada por los microtúbulos (Rietdorf et al., 2001) y por eso, al contrario que en ECTV-Moscow se ha decidido clasificar como gen y no como pseudogen.

Durante la morfogénesis y maduración de las partículas virales de VACV-WR recién producidas se generan unas estructuras densas en el citoplasma de la célula infectada que se conocen como ATIs, debidas a las proteínas ATIp y A27L (McKelvey et al., 2002). En el genoma de ECTV-Naval se encuentran intactos los dos genes ortólogos responsables de la formación de los ATIs: EVN147 y EVN149. Sin embargo, un tercer gen esencial para la incorporación de las partículas virales en los ATIs y ortólogo del gen P4c en VACV-WR, aparece truncado tanto en el genoma de ECTV-Naval (EVN148P) como en los de ECTV-Moscow, y ERPV.

Tabla R9. Genes conservados entre los ChPVs: genes del core.

Características/función	Gen en ECTV-Naval	Ortólogo en VACV-Cop	Referencia
Proteínas implicadas en transcripción			
Factor de activación temprana	EVN092	L3L	(Resch and Moss, 2005)
Factor de activación	EVN065	E8R	(Kato et al., 2007)
ARN helicasa	EVN079	I8R	(Bayliss and Smith, 1996)
Regulación de ARNm	EVN117	D10R	(Parrish et al., 2007)
Nucleósido fosfohidrolasa I (72 kDa)	EVN118	D11L	(Christen et al., 1998)
ARN polimerasa:			
Subunidad 147 kDa	EVN100	J6R	(Broyles and Moss, 1986)
Subunidad 133 kDa	EVN146	A24R	(Amegadzie et al., 1991b)
Subunidad 94 kDa	EVN104	H4L	(Ahn and Moss, 1992)
Subunidad 35 kDa	EVN151	A29L	(Amegadzie et al., 1991a)
Subunidad 30 kDa	EVN061	E4L	(Rosales et al., 1994)
Subunidad 22 kDa	EVN098	J4R	(Katsafanas and Moss, 1999)
Subunidad 19 kDa	EVN126	A5R	(Ahn et al., 1992)
Subunidad 18 kDa	EVN114	D7R	(Quick and Broyles, 1990)
Subunidad 7 kDa	EVN085	G5-5R	(Amegadzie et al., 1992a)
Factor de transcripción temprana:			
82 kDa	EVN128	A7L	(Gershon and Moss, 1990)
70 kDa	EVN113	D6R	(Broyles and Fesler, 1990)
Factor de terminación temprana:			
VTF, <i>capping</i> enzyme			
97 kDa	EVN108	D1R	(Morgan et al., 1984)
33 kDa	EVN119	D12L	(Niles et al., 1989)
Factor de transcripción intermedios:			
VITF-3	EVN145	A23R	(Sanz and Moss, 1999)
VITF-3	EVN129	A8R	(Sanz and Moss, 1999)
Factor de terminación tardíos:			
VLTF-1	EVN088	G8R	(Keck et al., 1990)
VLTF-2	EVN121	A1L	(Keck et al., 1990)
VLTF-3	EVN122	A2L	(Keck et al., 1990)
VLTF-4	EVN105	H5R	
Intermediate/late termination factors:			
Terminación ARNm	EVN140	A18R	(Xiang et al., 1998)
Factor de elongación	EVN082	G2R	(Black and Condit, 1996)
Factor de elongación	EVN097	J3R	(Latner et al., 2002)
PolíA polimerasa:			
Subunidad grande	EVN058	E1L	(Gershon et al., 1991)
Subunidad pequeña	EVN097	J3R	(Mohamed et al., 2001)
Proteínas implicadas en la replicación del ADN			
DNA polimerasa	EVN066	E9L	Challberg, M.D. y Englund. P.T., 1979.
Unión a ADN	EVN072	I1L	(Zhu et al., 1998)
Unión a ADN	EVN074	I3L	(Tseng et al., 1999)
ADN helicasa	EVN079	I8R	(Bayliss and Smith, 1996)
Resolución del concatamero	EVN106	H6R	(Shuman and Moss, 1987)

Características/función	Gen en ECTV-Naval	Ortólogo en VACV-Cop	Referencia
Glicosilasa de ADN	EVN111	D4R	(Upton et al., 1993)
Nucleósido trifosfatasa	EVN112	D5R	(Evans et al., 1995)
DNA helicasa	EVN140	A18R	(Simpson and Condit, 1995)
Factor de procesividad	EVN143	A20R	(Ishii and Moss, 2001)
Resolución del concatamero	EVN144	A22R	(Culyba et al., 2006)
Proteínas implicadas en rutas metabólicas, estructurales e implicadas en morfogénesis			
Ruta de formación de puentes disulfuro:			
	EVN067	E10R	(Senkevich et al., 2000)
	EVN083	G4L	(White et al., 2002)
	EVN123	A2.5L	(Senkevich et al., 2002)
Sustratos:			
	EVN049	F9L	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN089	G9R	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN090	L1R	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN094	L5R	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN099	J5L	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN102	H2R	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN138	A16L	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN150	A28L	(Van Vliet et al., 2009)
Fosforilasas/Defosforilasas:			
	EVN050	F10L	(Derrien et al., 1999)
	EVN101	H1L	(Derrien et al., 1999)
Sustratos:			
	EVN057	F17R	(Van Vliet et al., 2009)
Proteínas implicadas en rutas metabólicas, estructurales e implicadas en morfogénesis			
	EVN087	G7L	(Mercer and Traktman, 2005)
	EVN135	A14L	(Betakova et al., 1999)
	EVN139	A17L	(Betakova et al., 1999)
	EVN152	A30L	(Mercer and Traktman, 2005)
Cisteín-proteasa	EVN078	I7L	(Ansarah-Sobrinho and Moss, 2004a)
Sustratos:			
	EVN057	F17R	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN087	G7L	(Mercer and Traktman, 2005)
	EVN093	L4R	(Ansarah-Sobrinho and Moss, 2004a)
	EVN124	A3L	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN131	A10L	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN133	A12L	(Van Vliet et al., 2009)
	EVN139	A17L	(Ansarah-Sobrinho and Moss, 2004a)
Morfogénesis:			
	EVN052	F12L	(Zhang et al., 2000)
	EVN053	F13L	(Honeychurch et al., 2007)
	EVN080	G1L	(Ansarah-Sobrinho and Moss, 2004b)
	EVN084	G5R	(da Fonseca et al., 2004)
	EVN091	L2R	(Maruri-Avidal et al., 2011)
	EVN095	J1R	(Chiu and Chang, 2002)
	EVN107	H7R	(Satheshkumar et al., 2009b)
	EVN127	A6L	(Meng et al., 2007)
	EVN132	A11R	(Resch et al., 2005)
	EVN134	A13L	(Unger and Traktman, 2004)
	EVN135	A14L	(Mercer and Traktman, 2003)
	EVN137	A15L	(Van Vliet et al., 2009)
Complejo entrada-fusión, EFC:			
	EVN071	O3L	(Satheshkumar and Moss, 2009)
	EVN073	I2L	(Nichols et al., 2008)
	EVN081	G3L	(Izmailyan et al., 2006)
	EVN089	G9R	(Ojeda et al., 2006a)
Complejo entrada-fusión, EFC:			
	EVN099	J5L	(Wolfe et al., 2012)
	EVN102	H2R	(Senkevich and Moss, 2005)
	EVN138	A16L	(Ojeda et al., 2006b)
	EVN142	A21L	(Townsend et al., 2005)
	EVN150	A28L	(Senkevich et al., 2004)
Asociadas a EFC:			
	EVN049	F9L	(Brown et al., 2006)
	EVN090	L1R	(Bisht et al., 2008)
Proteínas estructurales de membrana:			
	EVN053	F13L	(Husain et al., 2003)
	EVN065	E8R	(Doglio et al., 2002)
	EVN076	I5L	(Unger et al., 2008)
	EVN093	L4R	(Bayliss and Smith, 1997)
	EVN095	J1R	(Chiu and Chang, 2002)
	EVN103	H3L	(da Fonseca et al., 2000)

Características/función	Gen en ECTV-Naval	Ortólogo en VACV-Cop	Referencia
	EVN107	H7R	(Satheskumar et al., 2009b)
	EVN109	D2L	(Dyster and Niles, 1991)
	EVN110	D3R	(Dyster and Niles, 1991)
	EVN120	D13L	(Weinrich et al., 1985)
	EVN125	A4L	(Cudmore et al., 1996)
	EVN130	A9L	(Yeh et al., 2000)
	EVN134	A13L	(Takahashi et al., 1994)
	EVN135	A14L	(Takahashi et al., 1994)
	EVN136	A14.5L	(Betakova et al., 2000)
	EVN154	A32R	(Cassetti et al., 1998)
	EVN156	A34R	(Duncan and Smith, 1992)
Proteínas conservadas de función desconocida			
	EVN056	F16L	
	EVN059	E2L	
	EVN063	E6R	
	EVN077	I6L	
	EVN086	G6R	
	EVN141	A19L	

6.2.2 Genes y pseudogenes de evasión de la respuesta inmune y determinantes del rango de hospedador

Aproximadamente una cuarta parte de los genes de los OPVs codifican para factores de virulencia, determinantes del rango de hospedador y proteínas que permiten evadir el sistema inmune. Estos genes se encuentran ubicados normalmente en los extremos 5' y 3' del genoma, y están poco conservados entre miembros del mismo género y en muchos casos de la misma especie. El genoma de ECTV-Naval, al igual que los de ECTV-Moscow y ERPV, presenta una distribución similar a lo largo del genoma, con 18 de estos genes en el extremo 5' y 22 en el extremo 3'. Sólo dos genes (EVN060 y EVN101) se encuentran codificados en la región central del genoma, genes que codifica para proteínas involucradas en rutas metabólicas del hospedador (Chen et al., 2003; Mendez-Rios et al., 2012). En estas regiones del genoma de ECTV también se detectan numerosos pseudogenes (tabla R8). Los pseudogenes son genes truncados o fragmentados que previsiblemente han perdido su funcionalidad durante la evolución desde un ancestro que contenía el gen íntegro. La mayoría de los pseudogenes detectados en el genoma de ECTV-Naval se localizan también en la región más variable de los extremos del genoma, pueden estar fragmentados por hasta 6 cambios de pauta de lectura y la mayoría presentan homología de secuencia con genes no fragmentados en CPXV y VACV que codifican para proteínas con funciones inmunomoduladores y de rango de hospedador.

6.2.2.1 Inhibición de citoquinas y quimioquinas

El genoma de CPXV cuenta con hasta 4 genes distintos de receptores del TNF (CrmB, CrmC, CrmD y CrmE). En ECTV-Naval, ECTV-Moscow y ERPV, sólo es funcional CrmD que está codificado por dos copias idénticas (EVN003 y EVN201) en las ITRs (Alejo et al., 2006). Este gen contiene también un dominio SECRET que le permite unir quimioquinas y su delección provoca una pérdida de virulencia de 7 órdenes de magnitud en ECTV-Naval (Tesis Doctoral de Sergio Martín Pontejo 2011, Universidad Autónoma de Madrid). Los homólogos de CrmB, CrmE y CrmC en ECTV-Naval están truncados y se han clasificado como pseudogenes (EVN002P/EVN205P, EVN005P/EVN202P y EVN175P, respectivamente) (tabla R8). El pseudogen de CrmB en los genomas de ECTV-Moscow y ERPV no está anotado, mientras que el pseudogen de CrmE sí está anotado en ECTV-Moscow pero no en ERPV (Chen et al., 2003;

Mendez-Rios et al., 2012). Otros dos genes homólogos al dominio SECRET de CrmD y que unen quimioquinas son EVN012 y EVN184 (Alejo et al., 2006). El primero codifica para una proteína de 202 aa que presenta una identidad de nucleótido del 42% con CrmB. La batería de genes destinados a modificar la actividad de las quimioquinas se completa con los genes EVN001/EVN206 y EVN163 que codifican para la vCKBP 35K y A41L, respectivamente (Alcamí et al., 1998; Ng et al., 2001). El gen EVN013 codifica para CD30 viral, un quinto modulador del TNF que se encuentra en CPXV y ECTV, pero no en VARV, VACV, MPXV y CMLV, que modula la respuesta Th1 *in vivo*, sin ser un factor de virulencia esencial durante la infección (Alejo et al., 2009).

Los genes EVN185 y EVN194 codifican para receptores secretados de IFN- γ (vIFN γ -R) y IFN- α/β (vIFN- α/β -R), respectivamente. El vIFN γ -R, codificado por el gen EVN185, interacciona específicamente con IFN γ de ratón y es un determinante de la virulencia de ECTV (Sakala et al., 2007; Smith and Alcamí, 2002). El vIFN- α/β -R, codificado por el gen EVN194, comparte con de CPXV una identidad superior al 90%, y un 88% con CMLV y VACV. La delección de EVN194 causa la atenuación del virus de 7 órdenes de magnitud del virus (Xu et al., 2008). A nivel intracelular, resulta interesante que ECTV carece de un ortólogo funcional de K3 (EVN043P), pese a ser una proteína clave para el bloqueo de la señalización de IFN. En contrapartida ECTV-Naval preserva el homólogo de E3 codificado por el gen EVN060 (Chen et al., 2003; Smith and Alcamí, 2002).

Otras proteínas moduladores de la actividad de las citoquinas pro-inflamatorias son los receptores de IL-1 β y de IL-18 codificados por los genes EVN191 (Alcamí and Smith, 1992) y EVN019 (Smith et al., 2000), respectivamente (Chen et al., 2003). Además, EVN168 codifica para un homólogo de VACV-Cop A46R que es un inhibidor de la señalización de IL-1 (Bowie et al., 2000) y EVN189 codifica para SPI-2/CrmA que es un inhibidor de la caspasa-1, fundamental para el procesamiento de IL-1 β e IL-18 (Ray et al., 1992; Turner et al., 1999). Otro gen de OPVs importante en la inhibición de la señalización intracelular mediada por IL-1, IL-18 y de receptores tipo Toll (TLR) es VACV-Cop A52R (Bowie et al., 2000; Harte et al., 2003). Sin embargo, su ortólogo en el genoma de ECTV-Naval codifica para una proteína un 33% más pequeña y se ha anotado como pseudogen (EVN174P), está anotada como pseudogen también en ECTV-Moscow pero en ERPV está presente como gen (ERPV159) (Bowie et al., 2000; Chen et al., 2003; Mendez-Rios et al., 2012).

6.2.2.2 Proteínas de la familia Bcl-2

Los genes EVN031, EVN168 y EVN190, ortólogos de VACV-Cop N1L, A46R y B15R, respectivamente, son genes de la familia Bcl-2 que codifican para proteínas que modulan la señalización de TLR, inhibiendo la activación de NF- κ B y bloqueando la expresión de IFN (González and Esteban, 2010).

Un cuarto gen de la familia Bcl-2 es EVN041, cuyo homólogo en VACV-Cop (F1L) codifica para un supresor de apoptosis que inhibe la caspasa-9 (C9). La proteína codificada por EVN041 en ECTV-Naval presenta 18 repeticiones de un péptido de 8 aa que nos llevó a anotarlo originalmente como pseudogen. Estas repeticiones se corresponden con la región que impedía el ensamblaje del genoma en un único *contig*. Sin embargo, los determinantes estructurales que permiten a F1 desarrollar sus dos funciones están intactos, por lo que se ha anotado como gen en la nueva anotación (Yu et al., 2011).

Por último, ECTV-Naval presenta dos pseudogenes más de esta familia: EVN040P y EVN174P con ortólogos funcionales (K7R y A52R, respectivamente) en VACV-Cop (tabla R8) (González and Esteban, 2010).

Tabla R8. Pseudogenes en ECTV-Naval

Pseudoge	Posición (bp)*	aa**	Características	Pseudogenes y/o genes ortólogos			
				ECTV-Moscow	ERPV	VACV-Cop	CPXV-BR
EVN002P	2.911-3.021	37	CrmB/ Unión a TNF y quimioquinas, dominio SECRET, secretado	-	-	B28R	CPXV005
EVN004P	5.075-5.324	54	Proteína tipo anquirina	A	2	C9L	CPXV008
EVN005P	5.321-5.503	61	CrmE/ Unión a TNF secretado	B	-	-	CPXV GRI K3R
EVN007P	6.549-7.381	102	Proteína tipo anquirina	C	3-4	B18R	CPXV211
EVN010P	10.442-10.934	48	Proteína tipo lectina	EVM006/ EVM007	ERPV006	-	CPXV012
EVN011P	11.013-11.183	57		-	5	-	CPXV013
EVN015P	15.050-15.274	75	Proteína tipo anquirina	E		C9L	CPXV017
EVN020P	18.843-20.332	36	Proteína tipo anquirina, CHOhr	F	6-7-8	C9L	CPXV025
EVN022P	20.934-21.619	199		G	9	C9L	CPXV027
EVN023P	21.621-22.060	50		H	10-11	C8L	CPXV028
EVN026P	23.712-24.029	106		I	-	C5L	CPXV032
EVN027P	24.091-24.621	176		J	12	C4L	CPXV033
EVN030P	27.138-27.723	55		K	13-14	C1L	CPXV036
EVN034P	30.175-30.846	33		L	15-16	M2L	CPXV040
EVN037P	33.251-33.474	31	Homólogo a eIF-2 α	M	-	K3	CPXV043
EVN040P	35.821-36.224	100	Fosfolipasa D	O	17	K7	CPXV046
EVN045P	40.511-41.466	43		P	18	F5L	CPXV052
EVN148P	145.428-145.979	183	Proteína P4c/ factor de inclusión a ATIs	Q	ERPV133/ ERPV134	A26L	CPXV159
EVN159P	151.807-151.875	23		R	19	A37R	CPXV173
EVN162P	154.914-155.405	9	Proteína tipo lectina	S	20	A40R	CPXV177
EVN167P	158.819-159.195	99	SOD	EVM144	ERPV152	A45R	CPXV183
EVN171P	161.491-161.981	116		T	ERPV156	A49R	CPXV187
EVN174P	164.806-165.320	127	inhibición NF- κ B	U	ERPV159	A52R	CPXV190
EVN175P	165.710-166.153	147	CrmC/ Unión TNF, secretado	V	-	A53R	CPXV191
EVN178P	169.110-169.699	72	Guanilato quinasa	W	21-22	A57R	CPXV195
EVN186P	177.551-178.350	43	Proteína tipo Kelch	X	23	B10R	CPXV204
EVN195P	186.617-188.997	158	Proteína tipo anquirina	Y	24-25-26-27	B20R	CPXV213
EVN198P	192.337-192.891	186		Z	-	C14L	CPXV218
EVN200P	199.206-200.883	60	Proteína tipo anquirina	CA	28-29-30-31	B18R	CPXV220
EVN202P	201.926-202.108	61	CrmE/ Unión TNF, secretado	BA	-	-	CPXV GRI K3R
EVN203P	202.105-202.266	54	Proteína tipo anquirina	AA	32	C9L	CPXV223
EVN205P	204.408-204.518	37	CrmB/ Unión TNF y quimioquinas, dominio SECRET, secretado		-	B28R	CPXV226

(*) = Se indica la posición del genoma de ECTV-Naval en la que se encuentran los fragmentos del pseudogen. (**) = Número de aa del primer fragmento del pseudogen.

6.2.2.3 Proteínas tipo anquirina y kelch

El genoma de los poxvirus contiene dos familias de genes que codifican por proteínas con dominios BTB/kelch y anquirinas/F-box. Estas proteínas interactúan con las ubiquitina ligasas basadas en culina-3 y culina-1, respectivamente, y modulan la ruta de degradación proteica.

En el genoma de ECTV-Naval se encuentran 4 genes que codifican para proteínas con dominio Kelch-BTB: EVN196, EVN176, EVN029 y EVN043. Estos genes tienen todos ortólogos en CPXV-BR, mientras que sólo los 3 últimos presentan un ortólogo en VACV-Cop. Los genes ortólogos de EVN196 y EVN176 en ECTV-Moscow (EVM150 y EVM167, respectivamente) interactúan con la maquinaria de ubiquitinación (Wilton et al., 2008). La proteína codificada por el ortólogo del gen EVN029 en VACV-Cop (C2) regula la adhesión a la matriz extracelular de forma independiente de Ca²⁺ (Pires de Miranda, 2003)

y el ortólogo de EVN043, en VACV-Cop (F3), está implicado en la evasión de la respuesta de las células NK (Froggatt et al., 2007). Existe además un quinto gen en ECTV-Naval (EVN008) que presenta el dominio BTB, pero no el dominio kelch, con función desconocida (tabla R8).

Entre los pseudogenes encontramos dos que codifican por proteínas kelch truncadas: EVN026P y EVN186P. En la primera anotación que se hizo de ECTV-Naval, EVN026P se había anotado como gen, sin embargo la proteína para la que codifica ha perdido el dominio BTB/kelch y tiene sólo 106 aa de los 204 aa presentes en su ortólogo en VACV-Cop (C5). En la anotación del genoma de ECTV-Moscow también se anotó como pseudogen (Región I) mientras que en ERPV está anotado como gen ERPV017.

En el genoma de ECTV-Naval se encuentran hasta 8 proteínas tipo anquirinas: EVN003/EVN204, EVN009, EVN014, EVN024, EVN033, EVN035, EVN181 y EVN193, que comparten más de un 90% de homología con sus ortólogos en otros OPVs. EVN003/EVN204, EVN009, EVN181 y EVN193, presentan repeticiones tipo anquirina en el extremo N-terminal y un dominio F-box en el extremo C-terminal con el que interaccionan con la maquinaria de ubiquitinación (Van Buuren et al., 2008a). En el caso de EVN003/EVN204 además de estar muy conservado entre todos los OPVs, desempeña un papel importante en virulencia a través de la inhibición de NF- κ B (Mohamed et al., 2009) Rubio D. 2013 Cell Host Microbe, in press.). EVN024 y EVN035 no presentan el dominio F-box, y sus ortólogos en VACV-Cop son determinantes del rango de hospedador e inhiben la actividad antiviral de IFN de tipo I (Meng et al., 2009).

En el genoma de CPXV se encuentran otros 6 genes de tipo anquirina que en ECTV-Naval, ECTV-Moscow o ERPV están truncados y por lo tanto se han anotado como pseudogenes: EVN004P/EVN203P, EVN007P/EVN200P, EVN015P, EVN020P, EVN22P y EVN195P. El ortólogo funcional de EVN20P en CPXV (CP77/CHOhr) es un importante determinante de rango de hospedador (Bratke et al., 2013).

6.2.2.4 Otros genes y pseudogenes

El gen EVN018 es un importante determinante de rango de hospedador en ECTV. Este gen codifica para p28, una ubiquitina ligasa con dominio RING y es esencial para la virulencia del virus *in vivo* (Huang et al., 2004; Senkevich et al., 1994).

En todos los genomas de los OPVs y en el genoma de los leporipoxvirus se encuentra el factor de crecimiento viral (VGF), homólogo viral del factor de crecimiento epidérmico, y que se ha descrito como un factor de virulencia (Buller et al., 1988a; Buller et al., 1988b). En el genoma de ECTV-Naval, VGF está codificado por el gen EVN016 y da lugar a una forma procesada de la proteína de 65 aa de tamaño inferior a su ortólogo funcional en VACV-Cop (C11R). EVN016 carece del dominio C-terminal de anclaje a la membrana pero conserva las 6 cisteínas esenciales para la estructura del dominio extracelular de proteína (Stroobant et al., 1985).

En el genoma de los poxvirus es frecuente encontrar proteínas que presentan un dominio lectina tipo C que permite la unión a carbohidratos y que en muchos casos está involucrado en la interacción entre proteínas de membrana. En el genoma de ECTV-Naval se han anotado dos pseudogenes (EVN162P y EVN010P) que contienen dominios lectina tipo C. El primero tiene un homólogo en VACV-Cop A40R cuya delección apenas afecta a la virulencia del virus en ratón (Tscharke

et al., 2002) ; datos no mostrados). El segundo está formado por dos fragmentos de un mismo gen que en la anotación original de ECTV-Naval y en el genoma de ECTV-Moscow aparecían como dos genes independientes. Sin embargo, recientemente se encontró un gen intacto que se correspondía con estos dos fragmentos en CPXV-Germany 91-3 (ABD97357). Se ha demostrado que una versión truncada de este gen en CPXV-BR (CPXV012) está implicada en la evasión de la respuesta de los linfocitos T CD8 al regular negativamente la presentación de MHC de clase I. Pese a presentar una identidad del 67% en los primeros 46 aa con CPXV012, el pseudogen en ECTV-Moscow parece no estar implicado en dicha función (tabla R8) (Alzhanova et al., 2009).

Otra diferencia en la nueva anotación del genoma ECTV-Naval ha sido la clasificación como pseudogenes de EVN167P y EVN171P. El gen ortólogo en VACV-Cop (A45R) de EVN167P codifica para una superóxido dismutasa (SOD) (Almazan et al., 2001). La versión de este gen en ECTV-Naval, con 99 aa, ha perdido un 38% de su longitud respecto a su ortólogo en VACV y 18 aa respecto a los ortólogos de ERPV y ECTV-Moscow, debido a una delección de una adenina en un homopolímero que fue confirmada por secuenciación Sanger e Illumina. El gen ortólogo funcional de EVN171P en VACV-Cop es A49R y no tiene función conocida.

6.3 Comparación del contenido génico de los aislados de ECTV

La anotación de los genomas de los nuevos aislados del virus ECTV, secuenciados en esta tesis doctoral, se ha realizado de forma similar a la anotación de ECTV-Naval. Para la nomenclatura de los genes de cada aislado se utilizó EV seguido de una letra para designar el aislado de ECTV al que corresponde (EVH: ECTV-Hampstead; EVHE: ECTV-Hampstead Egg; EVI: ECTV-Ishibashi; EVMH: ECTV-Mill Hill; EVM-1: ECTV-MP1; EVM-4: ECTV-MP4; EVM-5: ECTV-MP5; EVMK: ECTV-Moukre; EVC: ECTV-Cornell) y a continuación un número correlativo en función de la posición del gen en el genoma.

Al igual que en otras especies y géneros de la familia *Poxviridae*, el orden de los genes está altamente conservado entre los aislados de ECTV. La mayoría de los cambios a nivel de aa afectan a proteínas codificadas por los genes ubicados en los extremos del genoma (Tabla R11), lo cual es consistente con la mayor acumulación de cambios de nucleótidos en estas regiones. En la Figura R7 se representan las diferencias en contenido proteico de los 10 aislados de ECTV secuenciados en este trabajo con respecto a ECTV-Moscow.

6.3.1 Los aislados ECTV-Cornell, ECTV-Naval y ERPV

El genoma de ECTV-Cornell difiere en 4 posiciones del genoma de ECTV-Naval (tabla R5). El gen EVN041/EVC041 presenta un número variable de repeticiones de la secuencia "DIDNGIVQ" en todos los aislados (17 en ECTV-Naval y 45 en ECTV-Cornell) (Tabla R11). Las mutaciones en las otras 3 posiciones no comportan cambios a nivel proteico, por lo que en su repertorio de proteínas es prácticamente idéntico (Tabla R11). ECTV-Cornell y ECTV-Naval son los aislados que más se diferencian de los otros ECTV (Figura R7) y las proteínas codificadas por sus genes, tanto de los extremos como de la región central, presentan muchos cambios de aa que afectan a un gran número de proteínas. A diferencia de los otros aislados, estos dos virus presentan también una mayor proporción de proteínas con 2-10 aa diferentes con respecto a ECTV-Moscow. Ambos comparten el mismo codón de

parada temprano en los genes ortólogos a EVM144 y EVM013, que da lugar a una SOD truncada (EVC167P y EVN167P) y una versión 11 aa más corta de la proteína de unión a IL-18 (EVC019 y EVN019), respectivamente (tabla R7, R11 y R12). Además, ECTV-Cornell, al igual que ECTV-Naval, presenta intacto el gen EVC038 (Tabla R11) que codifica para una ADNasa de corte y unión de 424 aa. Su ortólogo en ECTV-Moscow, con sólo 186 aa, está anotado como pseudogen (región N). ERPV es un virus muy parecido a ECTV-Naval y ECTV-Cornell, con 11 posiciones distintas que alteran la secuencia de aa de 8 proteínas (Tabla R5). Curiosamente el pseudogen EVN026P/EVC026P, que codifica para una proteína que ha perdido el dominio BTB/kelch en ERPV está anotado como gen ERPV017 (Tabla R8).

Tabla R10. Cambios de gen a pseudogen y viceversa entre los aislados de ECTV.

Gen en ECTV-Moscow	Característica	Gen/Pseudogen en ECTV-Moscow
EVM001	35K, Proteína de unión a quimioquinas	Pseudogen en ECTV-Mill Hill
EVM002	Proteína tipo anquirina, inhibición de NF- κ B	Pseudogen en ECTV-Ishibashi
EVM006 y EVM007	Proteína tipo lectina	Gen en ECTV-Mill Hill, pseudogen en todos los otros aislados
EVM010	Proteína tipo anquirina	Pseudogen en ECTV-Mill Hill
EVM021	Proteína tipo anquirina	Pseudogen en ECTV-Hampstead Egg
Región N	ADNasa función de corte y unión, proteína tipo fosfolipasa D	Pseudogen en ECTV-Moscow, ECTV-hampstead, ECTV-ishibashi, ECTV-MP5, ECTV-MP1, ECTV-MP4
Región Q	P4c, factor de inclusión a los cuerpos de inclusión de tipo A	Gen en ECTV-Hampstead y ECTV-Hampstead Egg, pseudogen en todos los otros aislados
EVM139	Semaforina viral	Pseudogen en ECTV-Hampstead Egg
EVM144	Superóxido dismutasa	Pseudogen en ECTV-Naval y ECTV-Cornell
EVM154	Proteína tipo anquirina, interaccionan con la maquinaria e ubiquitinación	Pseudogen en ECTV-Hampstead Egg
EVM 156	-	Pseudogen en ECTV-Hampstead Egg

6.3.2 ECTV-Hampstead y ECTV-Moscow

Los aislados ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead se diferencian en 4 genes (Figura R7). Los dos primeros, EVM008/EVH012 y EVM028/EVH44 presentan cambios conservativos en un sólo residuo de las proteínas para las que codifican. Como estas dos posiciones en el genoma de ECTV-Hampstead eran idénticas en todos los otros aislados de ECTV excepto a ECTV-Moscow, confirmamos por PCR y secuenciación Sanger que no fueran errores en la secuencia publicada del genoma de ECTV-Moscow (Tabla R6). El gen EVM025 presenta un número variable de repeticiones de la secuencia "DIDNGIVQ" en todos los aislados (19 en ECTV-Hampstead y 28 en ECTV-Moscow; Tabla R11).

El tercer cambio es el más relevante, puesto que en ECTV-Moscow da lugar a un codón de parada en mitad de un gen (Región Q), cuyo ortólogo en VACV-WR (VACWR149) codifica para la proteína P4c (AAO89428.1) (Tabla R10). La ausencia de este codón de parada en ECTV-Hampstead permite la traducción de una proteína de tamaño completo (503 aa) que presenta un 96% de identidad de aa con VACWR149 y que media la inclusión de las partículas virales en los ATIs. Entre todos los

aislados de ECTV, sólo ECTV-Hampstead y ECTV-Hampstead Egg presentan esta forma completa del gen (Tabla R10, R11).

6.3.3 Los aislados atenuados

Los aislados ECTV-Hampstead Egg, ECTV-Ishibashi y ECTV-Mill Hill se obtuvieron tras sucesivos pases *in vitro*, lo que ha provocado una reducción de su virulencia en ratones (Ichichi Mastsumoto 1966, Fenner F. 1949). Como se puede apreciar en la Tabla R11 y en la Figura R7, sus genomas han conservado todos los genes implicados en replicación o morfogénesis y han perdido algunos genes de los extremos del genoma implicados en la modulación del sistema inmune o sin función conocida. A continuación se detallan las diferencias encontradas en estos 3 aislados con respecto a ECTV-Moscow, empezado por ECTV-Ishibashi que es el que menos cambios presenta.

6.3.3.1 ECTV-Ishibashi

ECTV-Ishibashi presenta diferencias provocan cambios de aa en 9 proteínas con respecto a ECTV-Moscow (tabla R.12, Figura R7). Entre estos cambios, el más relevante afecta al gen ortólogo de EVM002 que codifica para una proteína anquirina que es un importante inhibidor de la activación de NF- κ B (Tabla R11). Este gen en ECTV-Ishibashi presenta una delección de 23 nt que modifica su pauta de lectura e introduce un codón de parada temprano que le hace perder 90 aa de su extremo C-terminal. Por este motivo, se ha anotado como el pseudogen EVI003P (Tabla R10).

6.3.3.2 ECTV-Hampstead Egg

El aislado ECTV-Hampstead Egg se obtuvo tras más de 30 pases de ECTV-Hampstead en CAMs de huevo. Como consecuencia de estos pases se produjo una recombinación intragenómica (Figura R4) que ocasionó la pérdida de 6 genes en el extremo 5' del genoma y la duplicación de 3 genes del extremo 3' (Tabla R11). Los genes delecionados se corresponden a EVM004, EVM005, EVM008, EVM009, EVM010 y EVM011 en el genoma de ECTV-Moscow, y codifican para proteínas implicadas en la modulación de sistema inmune (Tabla R7): una proteína tipo kelch, dos proteínas tipo anquirinas, una proteína con dominio SECRET, CD30 viral y VGF. Los genes duplicados son los ortólogos EVM167, EVM168 y EVM169. Además, en comparación con el genoma de ECTV-Moscow, presenta cambios codificantes en 23 genes distribuidos a lo largo de todo su genoma (Tabla R11), 5 de los cuales (EVHE033P, EVHE161P, EVHE181P, EVHE038 y EVHE148) povocan cambios sustanciales en el tamaño de las proteínas por las cuales codifica debido a inserciones o delecciones que alteran la pauta de lectura (Tabla R10-R11). Los tres primeros son ortólogos de EVM021, EVM139 y EVM154 respectivamente y se han anotado como pseudogenes puesto que presentan un codón de parada temprano. EVM021 codifica para una semaforina viral, mientras que EVM139 y EVM154 codifican para 2 proteínas tipo anquirinas de las cuales la segunda está implicada en la modulación de la maquinaria de ubiquitinación (Barry et al., 2010). Los cambios que afectan a los genes EVHE038 y EVHE148, sin embargo, restauran una pauta de lectura de mayor tamaño. EVHE0038, al igual que el gen EVN038 de ECTV-Naval, codifican para una proteína de 424 aa, en lugar de los 186 aa del pseudogen ortólogo "Región N" de ECTV-Moscow. El gen EVHE148, al igual que en ECTV-Hampstead codifica para la proteína P4c intacta (Tabla R10).

6.3.3.3 ECTV-Mill Hill

El aislado ECTV-Mill Hill se obtuvo, al igual que ECTV-Hampstead Egg, tras sucesivos pases en CAMs de ECTV- Hampstead. Sin embargo, en su genoma no se ha producido ninguna reordenación genómica como en ECTV-Hampstead Egg. Los genes que presentan cambios respecto a ECTV-Moscow son 26 (Tabla R11) y de éstos, 17 codifican para proteínas que presentan 1 o 2 aa diferentes. Resulta interesante que 11 de estos cambios son los mismos que se han encontrado en ECTV-Hampstead Egg pero no en otros aislados (Tabla R11).

Solo 3 genes se han anotado como pseudogenes en ECTV-Mill Hill: EVMH001P, EVMH014P y EVMH148P (Tabla R10). El primero codificaría por una proteína 170 aa más corta que su ortólogo en ECTV-Moscow: EVM001. Esta proteína, conocida como la vCKBP 35 kDa está implicada en la unión a quimioquinas. La inserción de 1 nt en un homopolímero de 6xA (tabla R2), provoca un cambio de pauta de lectura en EVMH014P que le hace perder 452 aa en con respecto a su ortólogo de ECTV-Moscow: EVM010. Finalmente, el aislado ECTV-Mill Hill, al igual que ECTV-Moscow, presenta un codón de parada temprano en el gen que codifica para la proteína VACV-WR P4c (EVMH148P).

Por otro lado, ECTV-Mill Hill presenta dos genes: EVMH10 y EVMH38 que en ECTV-Moscow está anotados como pseudogenes. El primero de ellos está únicamente intacto en el genoma de ECTV-Mill Hill gracias a una inserción de 5 bp. Esta inserción modifica la pauta de lectura y daría lugar a una proteína de tamaño completo de 161 aa homóloga a la lectina tipo C (prot.ref. ABD97357) de CPXV-Germany 91-3. El gen EVMH10 en el genoma de ECTV-Moscow está fragmentado y anotado como EVM006 y EVM007. EVMH38, al igual que sus ortólogos ECTV-Hampstead Egg y sorprendentemente en ECTV-Naval y ECTV-Cornell, codifica para una proteína de 424 aa en lugar de los 186 aa del pseudogen ortólogo (Región N) de ECTV-Moscow (Tabla R10 y R12).

6.3.4 Los aislados del clado centroeuropeo

Los representantes del subclado centroeuropeo, los aislados ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5 y ECTV-MouKre, muestran pocos genes diferentes con respecto a ECTV-Moscow y en general con diferencias de sólo 1-2 aa (Tabla R11). Los 4 aislados comparten los mismos cambios con respecto a ECTV-Moscow en los genes ortólogos: EVM013, EVM024, EVM060 y EVM159. En el primero caso, se trata de un cambio en la pauta de lectura al final del gen, que se traduce en 5 aa distintos y una delección de 10 aa respecto a la proteína de unión a IL-18 codificada por ECTV-Moscow. Curiosamente y pese a pertenecer a grupos separados filogenéticamente, ECTV-Cornell y ECTV-Naval presentan exactamente el mismo cambio de pauta de lectura en este gen ortólogo a EVM013.

El gen EVMK038 en el genoma del aislado ECTV-MouKre, al igual que sus ortólogos EVHE038 y EVN038, codifica para una proteína de 424 aa en lugar de los 186 aa del pseudogen ortólogo "Región N" de ECTV-Moscow. Además, el gen ortólogo a EVM169 presenta una delección interna de 40 aa en ECTV-MouKre y muchos cambios de aa en la misma región de la proteína codificada por ECTV-MP5 (Tabla R11).

6.3.5 Variabilidad del gen de la P4c en los aislados de ECTV

El gen VACWR149 de VACV-WR codifica para la proteína P4c de 500 aa que es responsable de la inclusión de los IMVs en los ATIs. Entre los aislados de ECTV, se han encontrado 4 versiones truncadas de esta proteína en su extremo C-terminal que se han anotado como pseudogenes y una versión completa de 503 aa en ECTV-Hampstead y ECTV-Hampstead Egg (EVH148 y EVHE148, respectivamente) que comparten un 96% de identidad de aa con VACWR149 (Figura R8). ECTV-Mill Hill es el aislado que presenta la versión más corta de la proteína con tan sólo 59 aa e identidad con VACWR149 solo en los primeros 37 aa. Esto se debe a la presencia de un homopolímero de 6A en lugar de las 7A presentes en ECTV-Hampstead que cambia la pauta de lectura del gen e introduce un codón de parada temprano. La secuencia de este homopolímero se comprobó por secuenciación con Sanger (Tabla R5). Como hemos visto en apartados anteriores, los aislados ECTV-Moscow y ECTV-Naval son los más diferentes en contenido génico. Sin embargo, ambos conservan el mismo cambio a codón de parada temprano con respecto a ECTV-Hampstead (Tabla R6) dando lugar a una proteína P4c de 183 aa (Figura R8). ECTV-Ishibashi codifica para una proteína P4c de 225 aa debido a una delección de 4 nt en la posición 674 del gen de EVH148. Por último los aislados centroeuropeos presentan en este gen una delección de 2 nt en la posición 1.014 que provoca un cambio de ácido aspártico por glutamina en el aa 339 seguido por un codon de parada (Figura R8).

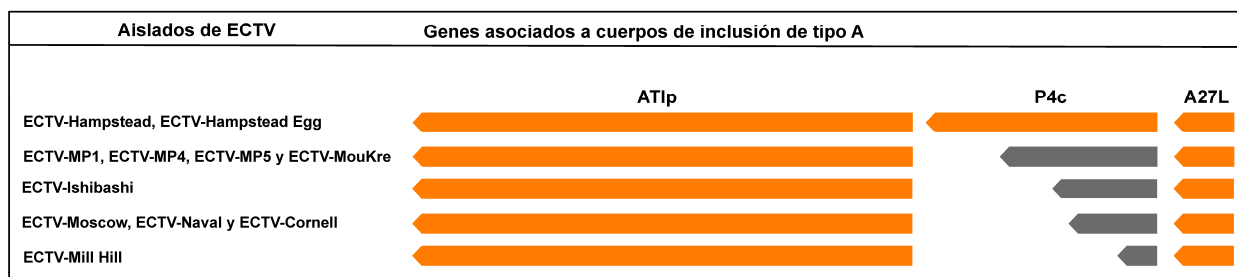


Figura R8. Variabilidad del gen que codifica para la proteína P4c en los aislados de ECTV. En naranja se representan los genes involucrados en procesos de morfogénesis y relacionados con la formación de los ATIs; en gris se muestran el tamaño relativo de los pseudogenes P4c.

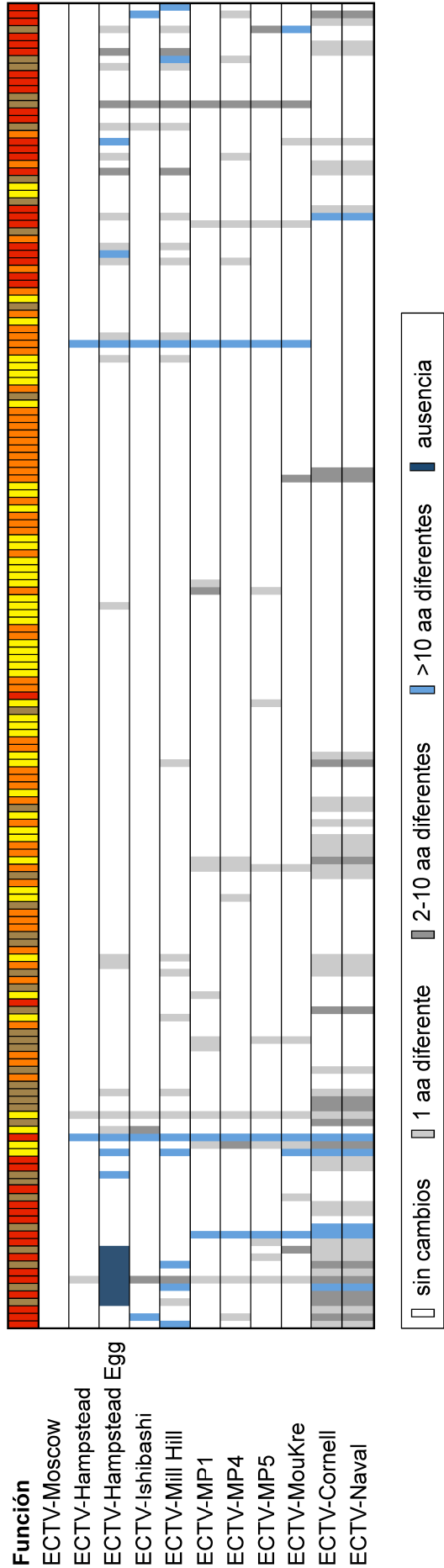


Figura R7. Representación gráfica de la variabilidad a nivel de aminoácido entre 10 aislados de ECTV y ECTV-Moscow. Representación gráfica de la variabilidad a nivel de aminoácido entre los aislados de ECTV. En la barra superior, se utiliza el mismo código de colores que el empleado en la Figura R6 para representar la función de cada proteína. En rojo se muestran los genes que modifican la respuesta inmune del hospedador o que determinan el rango de hospedador, en amarillo los genes implicados en el metabolismo de ADN y ARN, en naranja los genes estructurales, de entrada a la célula o de morfogénesis del virión, en marrón los genes con función desconocida. Cada rectángulo representa una ORF y el grado de alteración de su secuencia con respecto a su ortólogo en ECTV-Moscow se indica en tonalidades grises y azules.

Tabla R11. Diferencias entre las proteínas de 10 aislados de ECTV secuenciados y ECTV-Moscow.

Gen ECTV-	ECTV-	ECTV-	ECTV-	ECTV-	ECTV-	ECTV-	ECTV-	ECTV-	ECTV-	ECTV-
Moscow	Hampstead	Hampstead Egg	ECTV-Ishibashi	ECTV-Mill Hill	ECTV-MP1	ECTV-MP4	ECTV-MP5	ECTV-MouKre	ECTV-Cornell	ECTV-Naval
EVM001			L493S, R494Q, T495L, E496S, Del (497-587)	V73Y, S74P, E75K, E76K, V77S Del (235-744)					L170I	L170I
EVM002						V224I			V21A, A223V, S446F	V21A, A223V, S446F
EVM003									F263L	F263L
EVM004		Del (completa)		E184Q					G102D, E184Q	G102D, E184Q
EVM005		Del (completa)							P26S, N32S, L120R, K177Q, N160D, T182S, G205S, G244S, C272R	P26S, N32S, L120R, K177Q, N160D, T182S, G205S, G244S, C272R

Resultados

Gen ECTV-Moscow	ECTV-Hampstead	ECTV-Hampstead Egg	ECTV-Ishibashi	ECTV-Mill Hill	ECTV-MP1	ECTV-MP4	ECTV-MP5	ECTV-MouKre	ECTV-Cornell	ECTV-Naval
EVM006		Del (completa)		(EVM006+ EVM007) EVMH10						
EVM007		Del (completa)		(EVM006+ EVM007) EVMH10						
EVM008	V164A	Del (completa)	Ad (3-4) NI, V164A	Del (3-4) NI, V164A	V164A	V164A	V164A	V164A	I93V, V164A	I93V, V164A
EVM009		Del (completa)							M70T	M70T
EVM010		Del (completa)		Del (312-763)					I57R, K556N	I57R, K556N
EVM010,5		Del (completa)					I77V		A10T	A10T
EVM011		Del (completa)						T316Y,V317S, F318I,N319S, F320R	D5V	D5V
EVM012						T86A			T146/	T146/
EVM013					E122N, Y123I, L124W, A125L, E126K	E122N, Y123I, Y123I, L124W, A125L, E126K	H15R, E122N, Y123I, L124W, A125L, E126K	E122N, Y123I, L124W, A125L, E126K	T88I, E122N, Y123I, L124W, A125L, E126K	T88I, E122N, Y123I, L124W, A125L, E126K
EVM014					Del (127-138)	Del (127-138)	Del (127-138)	Del (127-138)	Del (1-10), Ins (41-44) de GVNG	Del (127-138) Del (1-10), Ins (41-44) de GVNG
EVM016									D86N	D86N
EVM017									D229Y, K255E	D229Y, K255E
EVM018								A120S		
EVM021		Del (1-182)								
EVM022									S32T	S32T
EVM023									G292S	G292S
Region N		Ad (187-424)		Ad (187-424)				Ad (187-424)	Ad (187-424)	Ad (187-424)
EVM024					A3T	A3T, F272L, N273I, R274E, Del (275-277)	A3T	A3T	V85I, Del (253) de H	V85I, Del (253) de H
EVM025	19xDIDNGIVQ	15xDIDNGIVQ	38xDIDNGIVQ	28xDIDNGIVQ	21xDIDNGIVQ	38xDIDNGIVQ	25xDIDNGIVQ	63xDIDNGIVQ	V14I, 45xDIDNGIVQ Ins (456) de G	V14I, 17xDIDNGIVQ Ins (456) de G
EVM026		S57P	T144Y, G145R							
EVM027									Y395H, G407D, I480M, R481E	Y395H, G407D, I480M, R481E
EVM028	I258V	I258V	I258V	I258V	I258V	I258V	I258V	I258V	I258V	I258V
EVM029									R22K, F71L, T72Q	R22K, F71L, T72Q

Gen ECTV-Moscow	ECTV-Hampstead	ECTV-Hampstead Egg	ECTV-Ishibashi	ECTV-Mill Hill	ECTV-MP1	ECTV-MP4	ECTV-MP5	ECTV-MouKre	ECTV-Cornell	ECTV-Naval
EVM030									N21, K22	N21, K22
EVM031		R11K		R11K					D9G	D9G
EVM034									N235K	N235K
EVM037					V36M					
EVM038					P29H		P29H	P29H		
EVM041				D110N						
EVM042									A69S, E379D	A69S, E379D
EVM044					I76V					
EVM047				T2I					K76E	K76E
EVM048		R7H							T3A	T3A
EVM049		S738P		S738P					S738P	S738P
EVM056						A244T				
EVM059									I64V	I64V
EVM060					S349Y	S349Y	S349Y	S349Y	S82G	S82G
EVM061					A475D	R518L			S116L, M387I	S116L, M387I
EVM062									I398M	I398M
EVM063									A66V	A66V
EVM064									D144G	D144G
EVM066									R352H	R352H
EVM068									N144D	N144D
EVM069									T228A	T228A
EVM074				L193F					L263I, I343T	L263I, I343T
EVM075									I181T	I181T
EVM082							L1220M			
EVM095		S486L								
EVM097					H67R, S206/		N175K			
EVM098					A55V					
EVM112								Ins (94-95) de NS	Ins (94-95) de NS	Ins (94-95) de NS
EVM113									G236R, A881V	G236R, A881V

Resultados

Gen ECTV-Moscow	ECTV-Hampstead	ECTV-Hampstead Egg	ECTV-Ishibashi	ECTV-Mill Hill	ECTV-MP1	ECTV-MP4	ECTV-MP5	ECTV-MouKre	ECTV-Cornell	ECTV-Naval
EVM127		V640I		V640I						
EVM128						G34C				
EVM129		D30A		D30A						
EVM138		Y268C		Y268C		S258A				
EVM139		Del (1-190)								
EVM140		V221D		V221D						
EVM144		D56G		D56G				N96M, D97I, Q98R, R99M Del (100-125)	P67S	N96M, D97I, Q98R, R99M Del (100-125)
EVM145								P67S		P67S
Región Q	Gen completo	Gen completo	Pseudogen	Pseudogen	Pseudogen	Pseudogen	Pseudogen	Pseudogen	Pseudogen	Pseudogen
EVM150		G285R, Y528H		G285R, Y528H					D358N	D358N
EVM151									D139Y	D139Y
EVM152		A241V				T198I				
EVM154		Q117I, Y118N, Q119I, L120N Del (121-564)						R487S	M389V	M389V
EVM 156		A152T	R19M	A152T						
EVM 159	Del interna (18-19) de TD		Ins (20-23) de TDTD	Del interna (16-19) de TDTD	Del interna (16-19) de TDTD	Del interna (16-19) de TDTD	Del interna (16-19) de TDTD	Del interna (16-19) de TDTD		
EVM 164	T31A			T31A						
EVM 165				Y439T, C440V, I441Y, L442F, Del (443-594)		R507I				
EVM 166	Ins (22-23) de SL			Ins (22-23) de SL					D144E	D144E
EVM 167									V241M	V241M
EVM 169	L1862I			L1862I			N622K, E623Q, R624K, R627G, R628A, R629A, Ins (631-632) de RV, Q635S	Del interna (610-650)		

Se indica el cambio de aminoácido con respecto a la secuencia de ECTV-Moscow. Del = Delección. Ins= Inserción. Ad= Adición. Entre paréntesis se indica la posición y los aa deletionados, insertados o añadidos en los extremos N- o C-terminal, en comparación con su ortólogo en ECTV-Moscow.

6.5 Caracterización de los aislados de ECTV *in vitro*

Después de definir el contenido génico de los aislados, quisimos valorar su capacidad infecciosa en cultivos celulares. Para ello, se ha realizado un seguimiento de la morfología de la placa de lisis y de la progresión de la infección en cultivos de células BS-C-1 de cada uno de los 11 aislados disponibles de ECTV. También se ha analizado por microscopía electrónica la capacidad de los diferentes aislados de formar ATIs y de incluir partículas virales en ellos.

6.5.1 Morfología y progresión de las placas de lisis

Todos los aislados de ECTV producen placas de lisis en células BS-C-1 cuando se emplea un medio semisólido (Figura R9, panel A). La morfología de placa que presentan todos los aislados es significativamente más pequeña que la de VACV. A las 48 hpi, la placa de lisis empieza a aparecer en todos los aislados, presentando una morfología redondeada y la típica aglomeración de células refringentes con forma de “racimos de uva” a las 72 y 96 hpi (Figura R9, panel B). En ECTV-MP1 y ECTV-MP5, a partir de las 96 hpi las células parecen fusionarse formando sincitios en torno a las placas de lisis que evolucionan para dar lugar a restos celulares esféricos de un tamaño muy superior al del resto de aislados de ECTV (Figura R9, panel B). A las 120 y 144 hpi, se observa un efecto citopático generalizado en el cultivo.

6.5.2 Ensayo de progresión de la infección *in vitro*

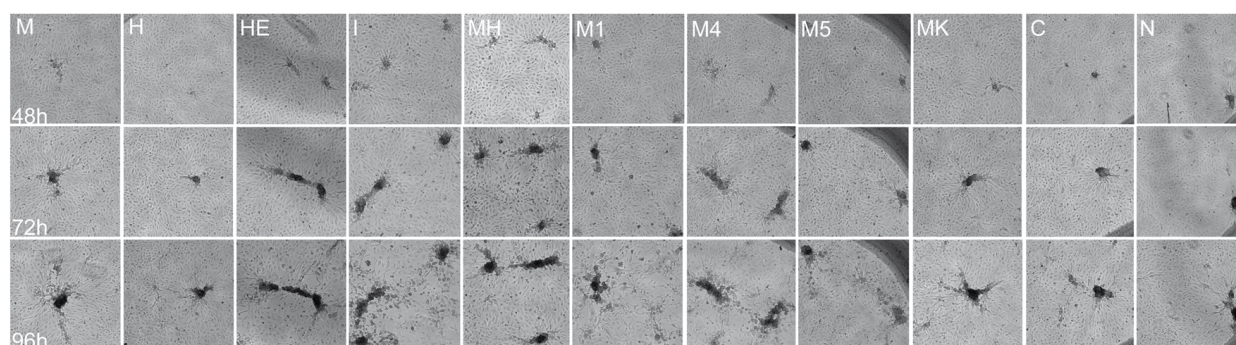
Se analizó la capacidad de los aislados de infectar un cultivo celular y progresar durante varios ciclos de infección. Así se infectó a moi baja una monocapa de células BS-C-1 y se tituló la progenie viral generada a las 24, 48 y 72 hpi (Figura R10, panel A). Todos los aislados, excepto ECTV-MP5 y ECTV-Mill Hill, progresaron de manera muy parecida, produciendo a las 72 hpi en torno a 2×10^6 ufp por pocillo de placa M6. Sin embargo, ECTV-MP5 alcanzó un título casi 10 veces superior en dos experimentos independientes (Figura R10, panel A).

Se ha descrito un cierto grado de atenuación de los aislados ECTV-Mill Hill, ECTV-Ishibashi y ECTV-Hampstead Egg en modelos animales, sin embargo esto no parece estar relacionado con un problema en su replicación puesto que todos ellos progresan en cultivos celulares y aumentan más de dos órdenes de magnitud en 72 h. No obstante, en dos experimentos independientes ECTV-Mill Hill alcanzó títulos ligeramente inferiores al resto de los aislados tanto a las 48 hpi como a las 72 hpi.

6.5.3 Cinética de infección

A continuación, quisimos analizar la producción de progenie viral para alguno de los aislados de ECTV durante un ciclo único de infección en células BS-C-1 (Figura R10, panel B). Para ello elegimos los aislados ECTV-MP1 y ECTV-MP5 por la formación de sincitios en torno a las placas de lisis y porque ECTV-MP5 alcanzaba títulos más altos en el experimento de progresión en cultivos celulares, ECTV-Mill Hill por presentar los títulos más bajos en el experimento de progresión, ECTV-Naval por ser el virus prototipo del laboratorio, ECTV-Hampstead y ECTV-Moscow por ser los aislados de referencia en la especie y finalmente ECTV-MouKre por ser el primer ECTV aislado de un ratón en la naturaleza. El experimento se hizo por duplicado para ECTV-Mill Hill y los aislados del subgrupo centroeuropeo.

A



B

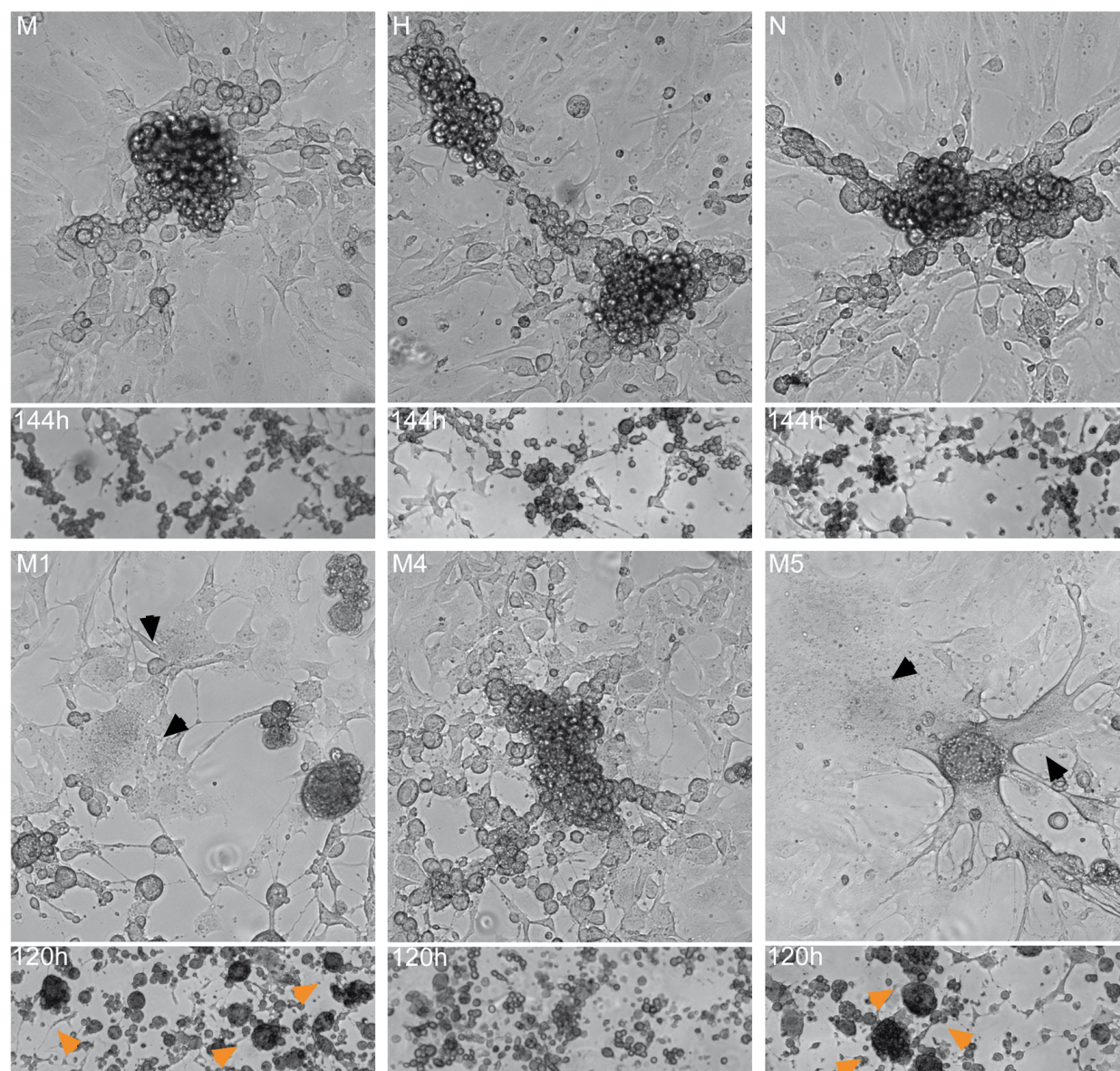


Figura R9. Morfología de la placa de lisis de 11 aislados de ECTV. (A) Se muestran placas de lisis representativas de la progresión en células BS-C-1 de los aislados de ECTV utilizando medio semi-sólido y (B) con mayor detalle para alguno de ellos a las 96 hpi, mostrando el efecto citopático a las 120 o 144 hpi. Las flechas negras indican la presencia de sincitios a las 96 hpi y las flechas naranja los restos celulares esféricos de gran tamaño a las 120 hpi en los aislados M1: ECTV-MP1 y M5: ECTV-MP5. M: ECTV-Moscow; H: ECTV-Hampstead; HE: ECTV-Hampstead Egg; I: ECTV-Ishibashi; MH: ECTV-Mill Hill; M4: ECTV-MP4; MK: ECTV-MouKre; C: ECTV-Cornell; N: ECTV-Naval.

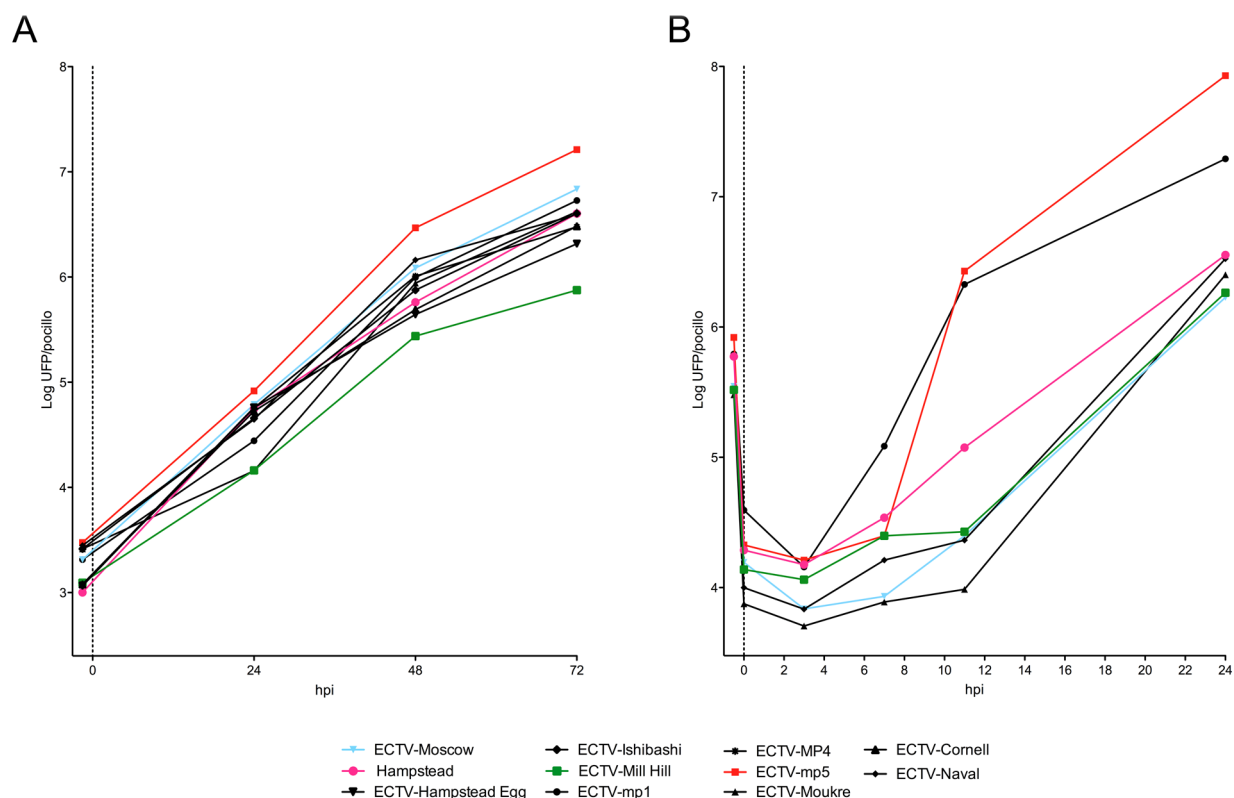


Figura R10. Cinética de crecimiento en cultivos celulares. (A) Ensayo de progresión de la infección *in vitro* de los aislados de ECTV. Células BS-C-1 se infectaron a moi 0,01 ufp/célula y la producción viral se determinó a 24, 48 y 72 hpi. Se muestra un experimento representativo de 2 (o 3 en el caso de ECTV-MP5). (B) Ciclo único de infección de células BS-C-1 con 7 aislados de ECTV a una moi 3,5-10 ufp/célula. Se muestran los títulos obtenidos a tiempos 0, 3, 7, 11 y 24 hpi. Tanto en (A) como en (B) el primer punto corresponde al título del inóculo empleado.

Como se puede observar en el panel B de la Figura R10, el ciclo de infección de ECTV-MP5 es el más rápido de entre todos los aislados probados ya que su título aumenta a las 10 hpi. Además, la progenie viral producida a las 24 hpi supera en casi dos órdenes de magnitud a la producida por los demás aislados. A diferencia del experimento anterior, ECTV-MP1 muestra un fenotipo similar a ECTV-MP5, y ECTV-Mill Hill no parece diferente al resto de los virus analizados.

6.5.4 Formación de ATIs

A raíz de la diversidad genética en el gen P4c quisimos investigar el fenotipo de los ATIs en los diferentes aislados. Para ello, se infectaron células BS-C-1 a alta moi y los ATIs se analizaron a las 24 hpi por microscopía electrónica. Se examinaron los ATIs en al menos 40 células de cada aislado. Se define el fenotipo V⁻ cuando ningún ATI presenta partículas virales IMVs en su interior o en el perímetro del cuerpo de inclusión. Por el contrario, cuando se detecta la presencia de partículas virales incluidas o en la periferia de algún ATIs se dice que presentan fenotipo V⁺ (Ichihashi and Matsumoto, 1966; McKelvey et al., 2002).

A las 24 hpi, casi todas las células infectadas con cada aislado de ECTV presentaban ATIs (Figura R11) lo que está de acuerdo con la presencia del gen intacto que codifica para la proteína ATIp (EVM128 en ECTV-Moscow; Tabla R4). Solo los aislados ECTV-Hampstead y ECTV-Hampstead Egg presentaban ATIs V⁺ (Figura R11, panel A) ya que más del 90% de los ATIs encontrados en las células infectadas presentaban tanto partículas incluidas como adheridas a la superficie de los ATIs.

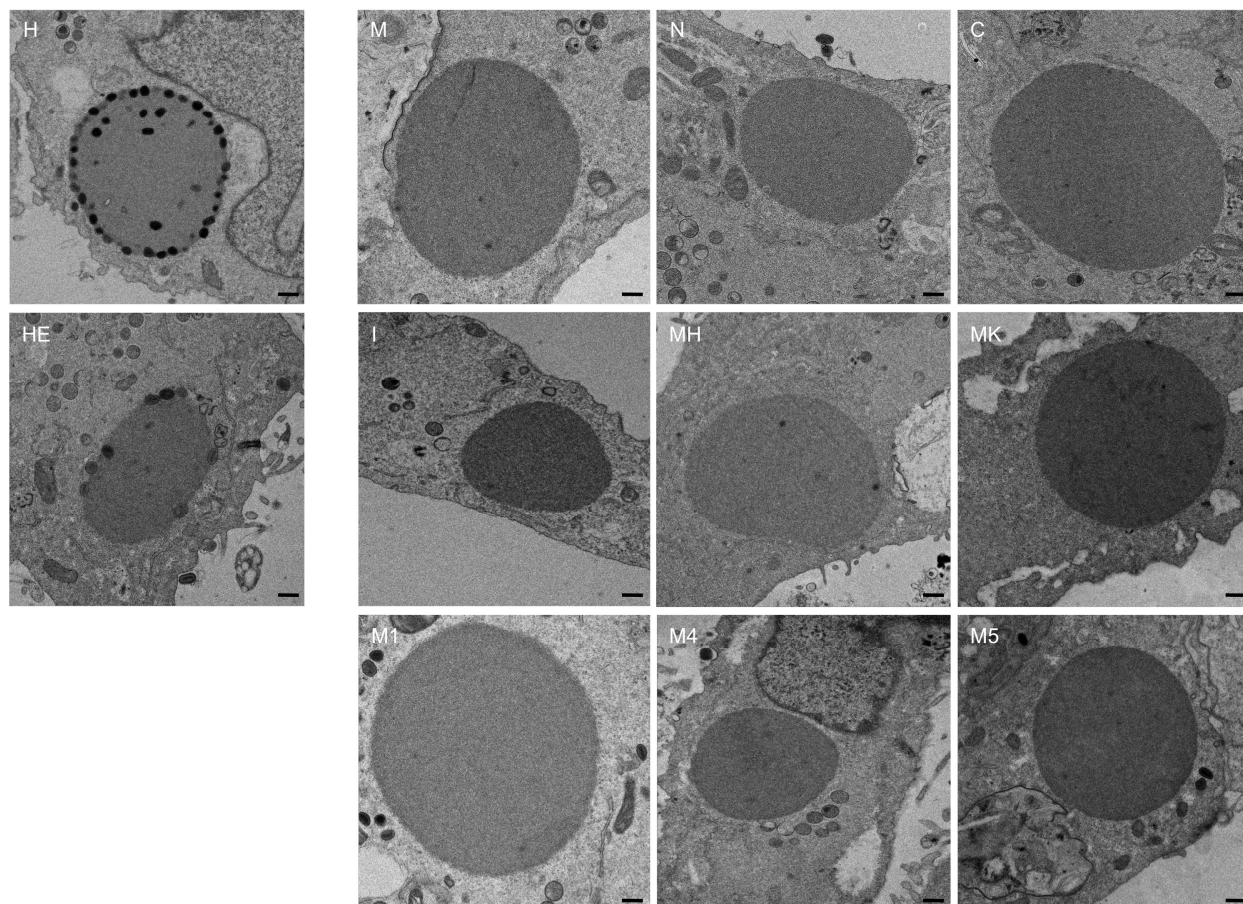


Figura R11. ATIs en células infectadas con los aislados de ECTV. Se muestra una imagen de un ATI representativo para cada aislado obtenida por microscopía electrónica de células BS-C-1 infectadas con los diferentes aislados de ECTV y fijadas 24 hpi. (A) Se muestran los aislados con fenotipo ATI V^+ y (B) los aislados con fenotipo ATI V^- . H: ECTV-Hampstead; HE: ECTV-Hampstead Egg; I: ECTV-Ishibashi; MH: ECTV-Mill Hill; M1: ECTV-MP1; M4: ECTV-MP4; M5: ECTV-MP5; C: ECTV-Cornell; N: ECTV-Naval; M: ECTV-Moscow y MK: ECTV-MouKre. Barras: 200 nm.

Estos dos aislados son los únicos aislados de ECTV que codifican para la proteína P4c con un tamaño similar a su ortólogo en VACV-WR, que también presenta fenotipo ATIs V^+ (Tabla R11, Figura R8). El resto de los aislados de ECTV tienen el gen ortólogo de P4c truncado en mayor o menor grado y presentaban fenotipo V^- ya que en al menos 40 ATIs inspeccionados en células infectadas no se pudo detectar ATIs con partículas virales asociadas (Figura R11, panel B). En algunos de estos ATIs se observaba la presencia de unos puntos más oscuros en su interior con un tamaño inferior al de los IMVs. Se desconoce su naturaleza, pero podrían ser agregados proteicos de la proteína ATIp o de otro tipo, o incluso impurezas de las preparaciones.

6.6 Caracterización de la virulencia de los aislados de ECTV *in vivo*

Con el objetivo de identificar genes que pudieran estar jugando un papel importante en la virulencia del virus *in vivo* abordamos un estudio comparativo de la patogénesis en ratones BALB/c ocasionada por los 11 aislados de ECTV disponibles.

6.6.1 Comparación de la infección con ECTV en ratones de diferente procedencia

Antes de caracterizar los diferentes aislados *in vivo*, se llevó a cabo un experimento piloto, analizando ratones proporcionados por dos proveedores diferentes para determinar el mejor modelo animal para un estudio comparativo como el que queríamos realizar. Se probaron los ratones BALB/c de los proveedores Charles River y Harlan, y de este último se utilizaron ratones de colonias de tres países diferentes: Holanda, Inglaterra e Italia. Este experimento de prueba se realizó con el aislado ECTV-Naval, cuya virulencia y progresión de la patología se ha estudiado previamente con detalle utilizando la vía FP. Para ello, se infectaron por esta ruta grupos de 5 ratones hembras BALB/c con 4 dosis (10 , 10^2 , 10^3 y 10^4 ufp) y se analizó la progresión de la enfermedad y la pérdida de peso durante dos semanas (datos no mostrados).

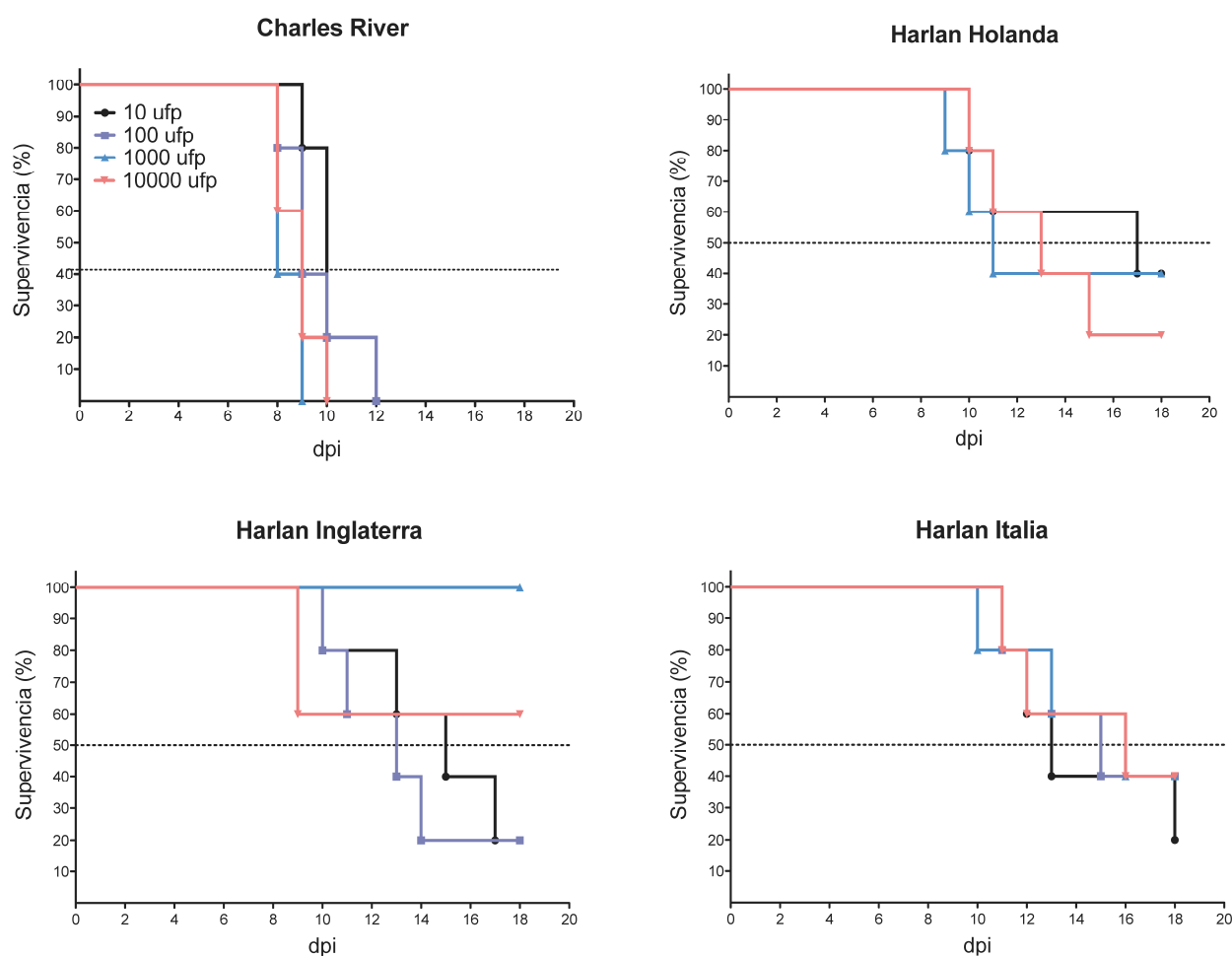


Figura R12. Comparación de la mortalidad producida por ECTV-Naval en ratones BALB/c de distintos proveedores infectados FP. Grupos de 5 ratones BALB/c hembras de 6 semanas se infectaron con 10 , 10^2 , 10^3 y 10^4 ufp del virus ECTV-Naval. Se muestra el porcentaje de supervivencia de los ratones durante 14 días.

Los ratones BALB/c de Charles River empezaron a morir a los 8 dpi, un día antes que los de Harlan (Figura R12). Los grupos de ratones de Charles River infectados con dosis mayores murieron antes que los de dosis menores y a los 12 dpi todos los ratones habían muerto. Los ratones BALB/c proporcionados por Harlan mostraron claramente una mayor resistencia a la infección por ECTV-Naval. Aunque la muerte de los ratones provenientes de Italia y Holanda también ocurría antes en los grupos inoculados con dosis mayores, quedaron ratones vivos en todos los grupos al finalizar el experimento. En el grupo de ratones provenientes de Inglaterra se observó mayor número de muertes con dosis bajas de virus y con 10^3 ufp no murió ningún ratón. El hecho de que los ratones de Harlan infectados con ECTV-Naval no murieran de forma dependiente de dosis y la mayor resistencia a la infección, nos llevó a elegir los ratones BALB/c de Charles River para futuros experimentos.

6.6.2. Comparación de la virulencia de los aislados de ECTV

El método más utilizado para determinar el grado de virulencia de un virus es el cálculo de su DL_{50} . Se infectaron vía FP grupos de ratones hembras BALB/c (Charles River) de 6 semanas con 3 o 4 dosis seriadas de orden 10, y durante al menos 18 d se anotó la mortalidad y se monitorizó la progresión de la enfermedad valorando los síntomas, peso e inflamación de la pata. La supervivencia de los ratones infectados con todas las dosis utilizadas y la DL_{50} se indican en la Tabla R12. A continuación se agrupan los aislados en función de su distinto grado de virulencia.

Tabla R12. DL_{50} de los aislados de ECTV y número de supervivientes en los experimentos *in vivo*.

Aislado de ECTV	ufp						LD_{50} (ufp)
	1	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
ECTV-Naval	0/5	0/5	1/5				<1
ECTV-Cornell	0/5	0/5	0/5				<1
ECTV-Moscow	0/5	0/5	0/5				<1
ECTV-Ishibashi					5/5	5/5	4/5
ECTV-Mill Hill					5/5	5/5	5/5
ECTV-Hampstead Egg					5/5	5/5	5/5
ECTV-Hampstead	3/10	6/10	4/10	4/5			nd
ECTV-MP1	5/10	2/10	0/5	0/5			≈ 1
ECTV-MP4	5/5	4/5	5/5	7/10	0/5	0/5	$\approx 10^3$
ECTV-MP5	5/5	4/5	4/10	1/10			$10 < x < 10^2$
ECTV-MouKre	5/5	3/10	2/10	0/5			≈ 10

Se indica el número de ratones supervivientes al finalizar el experimento y el número de ratones infectados. nd: no determinado.

6.6.2.1 Los aislados atenuados atenuados

Datos previos habían demostrado que los aislados ECTV-Hampstead Egg, ECTV-Ishibashi y ECTV-Mill Hill estaban atenuados *in vivo* por lo que decidimos infectar grupos de 5 ratones con dosis altas de 10^4 , 10^5 y 10^6 ufp. En la Figura R13 se muestran sólo los resultados de la dosis mayor, por ser representativos del fenotipo atenuado. De todos los ratones infectados con estos virus, sólo se registró la muerte de un ratón infectado con la dosis más alta de ECTV-Ishibashi a los 6 dpi (Figura R13, panel A). Por tanto, la DL_{50} para estos aislados es superior a 10^6 ufp (Tabla R12).

Los ratones infectados con ECTV-Hampstead Egg no presentaron pérdida de peso, mientras que los ratones infectados con ECTV-Mill Hill y ECTV-Ishibashi llegaron a perder un 6 y un 9 % de su peso inicial a los 15 dpi, respectivamente (Figura R13, panel B). La diferencia de pérdida de peso que se registró en los ratones infectados con ECTV-Mill Hill y ECTV-Ishibashi fue estadísticamente significativa con respecto a ECTV-Hampstead Egg.

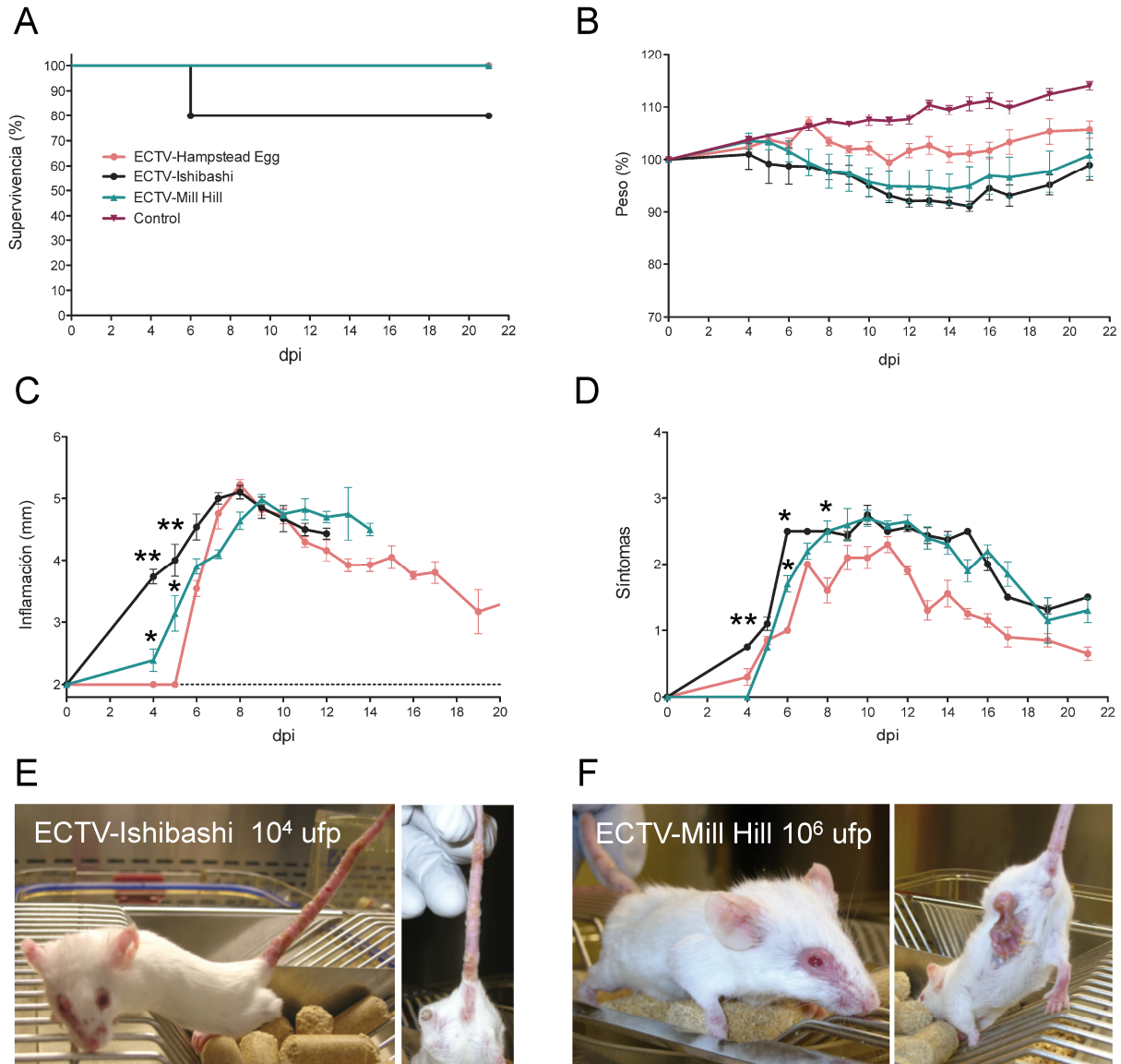


Figura R13. Virulencia de ECTV-Hampstead Egg, ECTV-Ishibashi, ECTV-Mill Hill en ratones BALB/c infectados FP. Se infectaron grupos de 5 ratones BALB/c con 10⁶ ufp de los distintos virus. (A) Se monitorizaron los ratones durante 20 d y se muestra el porcentaje de animales supervivientes, (B) porcentaje de peso con respecto al inicio del experimento, (C) inflamación de la pata inoculada y (D) el grado de enfermedad. Imágenes de ratones infectados con ECTV-Ishibashi (E), ECTV-Mill Hill (F) a 14 dpi en los que se aprecia la inflamación de la pata inoculada con estrangulamiento, la pérdida de la extremidad o del pelo alrededor de los ojos y pústulas repartidas por toda la cola. (*= p<0.05; **=p<0.01).

Se pudo detectar inflamación temprana en la pata de los ratones infectados a partir de los 4 dpi para ECTV-Ishibashi, los 5 dpi para ECTV-Mill Hill y los 6 dpi para ECTV-Hampstead Egg (Figura R13, panel C). La fuerte inflamación ocurrida en las patas de los ratones infectados con ECTV-Ishibashi y ECTV-Mill Hill evolucionó en la mayoría de los animales estrangulando la zona de inoculación y mutilando la extremidad en todos los ratones infectados con ECTV-Ishibashi y sólo en uno infectado con

ECTV-Mill Hill (Figura R13, panel E y F). La inflamación en ECTV-Hampstead Egg provocó la formación de costras pero no el estrangulamiento ni la pérdida de la extremidad, resolviéndose al final del experimento (Figura R13, panel F). La mayor gravedad de la enfermedad ocasionada por ECTV-Mill Hill y ECTV-Ishibashi, en comparación con ECTV-Hampstead Egg se tradujo también en la aparición de pústulas en la cola, pérdida de pelo en la zona ocular (Figura R13, panel E y F), y valoraciones de síntomas de enfermedad cercanas al 3, de las cuales se recuperaron lentamente.

6.6.2.2 Los aislados virulentos

Para los aislados ECTV-Moscow, ECTV-Naval y ECTV-Cornell se infectaron grupos de 5 ratones con dosis bajas de 1, 10 y 10^2 ufp y se muestran sólo los resultados de la dosis menor, por ser representativos de la alta virulencia de estos aislados (Figura R14). Los datos obtenidos con ECTV-Naval son similares a los anteriores del experimento de prueba (Figura R12). La mortalidad de los ratones infectados con los tres aislados fue muy parecida. Los ratones empezaron a morir a los 10 dpi y a los 13 dpi no quedaron supervivientes, con la única excepción de un ratón en el grupo de ECTV-Naval que murió a los 19 dpi (Figura R14, panel A). La DL_{50} para estos aislados es por tanto inferior a 1 ufp (Tabla R12).

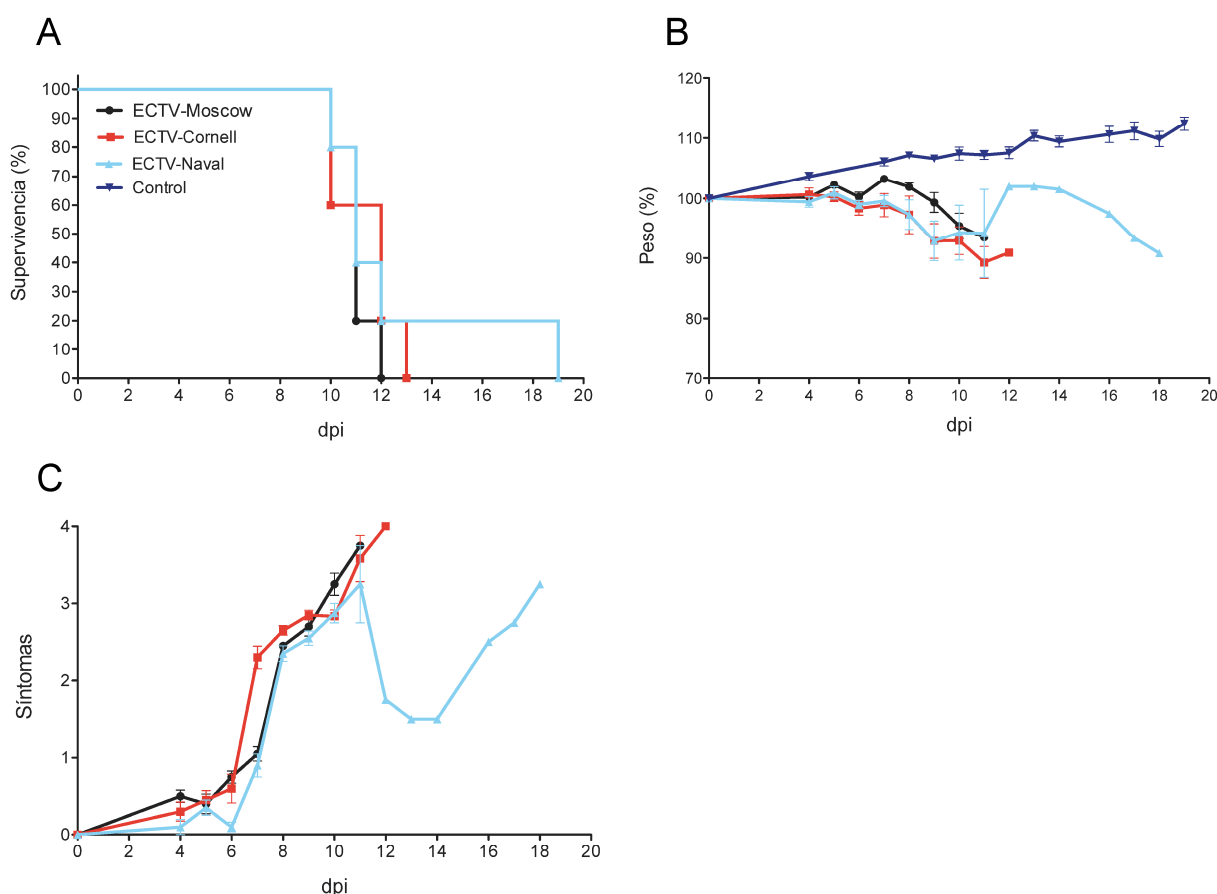


Fig. R14. Virulencia de ECTV-Moscow, ECTV-Naval y ECTV-Cornell en ratones BALB/c infectados FP. Se infectaron grupos de 5 ratones BALB/c con 1 ufp de los distintos virus. (A) Se monitorizaron los ratones durante 20 d y se muestra el porcentaje de animales supervivientes, (B) el porcentaje de peso respecto al peso inicial, (C) y la gravedad de la enfermedad.

La pérdida de peso de los ratones infectados con ECTV-Naval y ECTV-Cornell fue muy parecida con una media de un 7,2% a los 9 dpi, cuando todavía todos los ratones estaban vivos. En el caso de los

ratones infectados con ECTV-Moscow se observó una pérdida de peso similar pero 1-2 d retrasada (Figura R14, panel B). A diferencia de los virus atenuados, no detectamos inflamación de la pata en los ratones infectados con estos virus virulentos. La puntuación fue para todos los ratones muy cercana a 4, presentando síntomas muy graves como encorvamiento, conjuntivitis y ausencia de movilidad. El ratón de ECTV-Naval que murió más tarde pareció recuperarse entre los 12 y 14 dpi, pero a partir del 16 dpi volvió a presentar síntomas muy graves de enfermedad hasta su muerte a los 19 dpi

6.6.2.3 Aislados de virulencia intermedia

La mortalidad y la valoración de los síntomas de enfermedad de los ratones infectados con los aislados ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5 y ECTV-MouKre ocurrió de forma dosis-dependiente (Figura 15, panel A y D). La DL_{50} para estos aislados resultó intermedia entre la de los grupos atenuados y virulentos (Tabla R12). El más virulento fue ECTV-MP1, que mató con 10 ufp al 80% de los ratones y con 10^2 y 10^3 ufp al 100% de los ratones a los 9-11 dpi. La mortalidad de los ratones infectados con ECTV-MP5 y ECTV-MouKre fue muy similar entre ellos y algo inferior a ECTV-MP1. Así, la dosis de 1 ufp resultó inocua en ambos aislados y la dosis 10^3 ufp provocó la muerte del 60% (ECTV-MP5) y 80% (ECTV-MouKre) de los ratones a los 9-10 dpi. El aislado menos virulento fue ECTV-MP4 que no fue capaz de matar ningún ratón con 10^2 ufp y las puntuaciones de enfermedad de estos ratones no llegaron a valores de 3, valores que sí se alcanzaron con 10^2 ufp en los tres casos (Figura R15, panel D).

No se observó una pérdida de peso significativa en los ratones infectados con ECTV-MP5 y ECTV-MouKre. Sin embargo ECTV-MP1 causó una pérdida de peso superior al 10% y más temprana cuanto mayor era la dosis empleada. En el caso de ECTV-MP4 se detectó una pérdida del peso cercana al 10% con 10^3 ufp (Figura R15, panel B).

Dosis altas de ECTV-MP1, ECTV-MP4 y ECTV-MP5 provocaron una inflamación de la pata entre 6 y 7 dpi que superó los 4 mm a 8 dpi, de forma similar a lo observado para los aislados atenuados. La inflamación producida por ECTV-MP5 remitió posteriormente, mientras que la causada por ECTV-MP4 evolucionó con la aparición de costras y estrangulamiento de la extremidad, pero no con la pérdida de la extremidad como ocurría con el aislado atenuado ECTV-Ishibashi (Figura R15, panel C). Curiosamente, y a diferencia de ECTV-MP5, no se observó inflamación con el aislado de campo ECTV-MouKre pese a presentar una virulencia similar y pocas diferencias en su genoma (Figura R15, panel C).

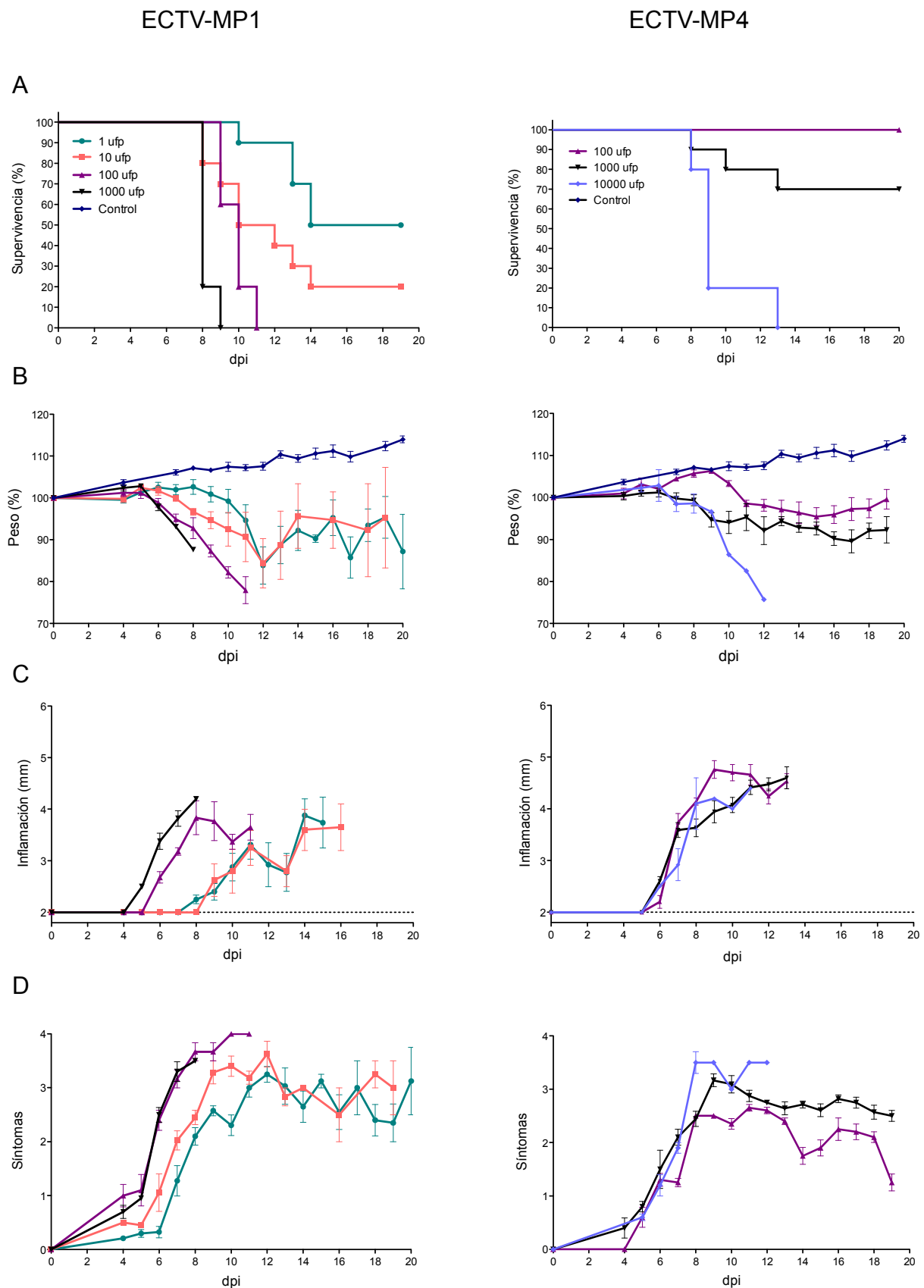


Figura R15. Virulencia de ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5 y ECTV-MouKre en ratones BALB/c infectados FP. (A) Se monitorizaron los grupos de 5 ratones durante 20 d y se muestra el porcentaje de animales supervivientes, (B) porcentaje de peso con respecto al inicio del experimento, (C) la inflamación de la pata inoculada y (D) el grado de enfermedad. Los datos representan los resultados de dos experimentos independientes para las dosis 1 y 10 ufp de ECTV-MP1, 10^3 ufp de ECTV-MP4, 10^2 y 10^3 ufp de ECTV-MP5 y 10 y 10^2 ufp de ECTV-MouKre.

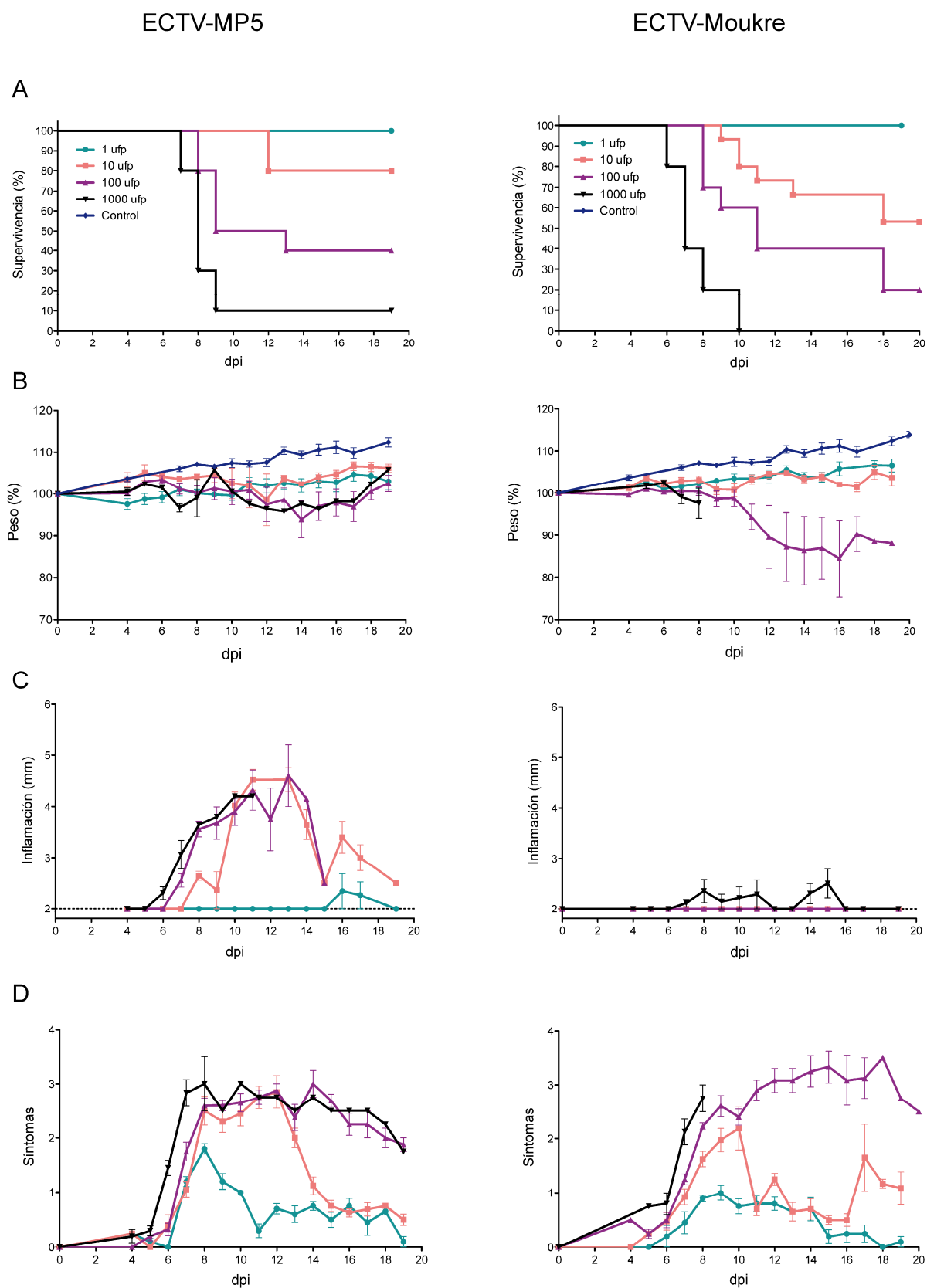


Figura R15. Continuación de Figura.

6.6.2.4. El aislado ECTV-Hampstead

Para el aislado ECTV-Hampstead, los resultados que se presentan son las medias de dos experimentos independientes. En total se han utilizado 10 ratones para las dosis de 1, 10, 10^2 ufp y 5 para la de 10^3 ufp (Figura R16).

Los ratones infectados con ECTV-Hampstead empezaron a morir entre los 9 y 10 dpi. A diferencia de los aislados virulentos, la muerte no fue dosis-dependiente, ya que con la dosis menor se observó una supervivencia del 30%, mientras que con la dosis mayor fue del 80% (Figura R16, panel A). Esto impidió la determinación de la DL_{50} . Tampoco hubo una correlación clara entre la dosis y la pérdida de peso (Figura R16, panel B).

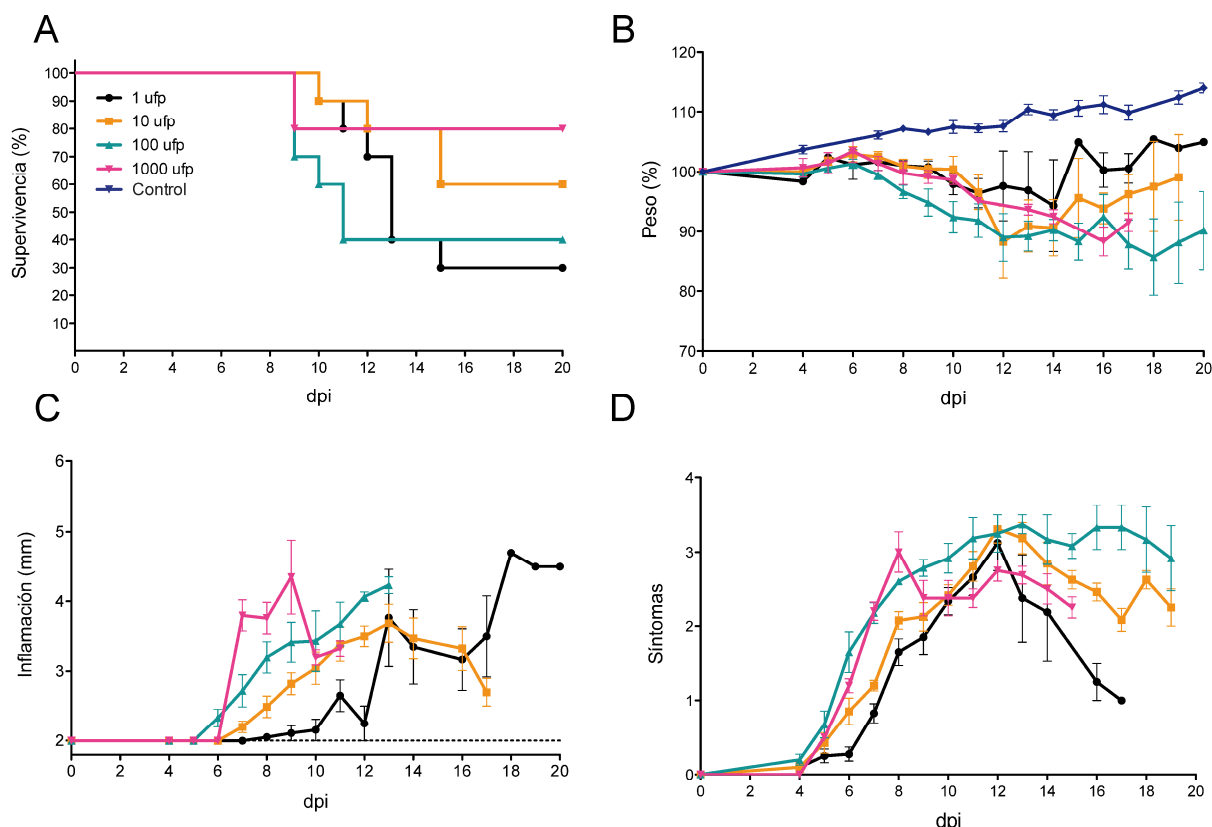


Figura R16. Virulencia de ECTV-Hampstead en ratones BALB/c infectados FP con 1, 10, 10^2 y 10^3 ufp de ECTV-Hampstead. (A) Se monitorizaron los ratones durante 20 d y se muestra el porcentaje de animales supervivientes, (B) porcentaje de peso con respecto al inicio del experimento, (C) inflamación de la pata inoculada y (D) el grado de enfermedad. Los datos representan los resultados de dos experimentos independientes para las dosis 1, 10 y 10^2 ufp.

A diferencia de los aislados virulentos, la infección con ECTV-Hampstead provocó la inflamación de la pata inoculada, si bien esta ocurre a partir de los 7 dpi, varios días después del inicio de la inflamación producida por los aislados atenuados. En contraposición a la ausencia de un efecto dosis-dependencia en mortalidad y pérdida de peso, cuanto mayor era la dosis utilizada, mayor y más temprana era la inflamación (Figura R16 panel C). De forma similar, los ratones infectados con las dos dosis mayores presentaron puntuaciones altas con síntomas graves como encorvamiento, conjuntivitis y ausencia de movilidad desde los 6 dpi. En cambio, los ratones infectados con las dos dosis menores, alcanzaron puntuaciones similares pero 4 d después (Figura R16, panel D).

6.7. Diseminación y transmisión *in vivo* de los aislados ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead

La virulencia *in vivo* de ECTV-Hampstead y de ECTV-Moscow es muy diferente a pesar de que sus genomas son casi idénticos en contenido génico. ECTV-Moscow es altamente virulento en ratones BALB/c, con una LD_{50} inferior a 1 ufp (Tabla R12), mientras que ECTV-Hampstead presentaba una virulencia inferior sin un claro efecto dosis dependiente y con ratones supervivientes a dosis de 10^3 ufp (Figura R16). La diferencia más drástica que podría explicar el distinto grado de virulencia afecta al gen que codifica para la proteína P4c, intacta en ECTV-Hampstead y truncada en ECTV-Moscow (Figura R8). De forma consistente con lo observado en cultivos celulares (Figura R11), en cortes de bazo de ratones infectados las partículas IMVs de ECTV-Hampstead se encontraron incluidas o en la periferia de los ATIs V^+ (Figura R17, panel A). Por el contrario, el aislado ECTV-Moscow presentaba un fenotipo ATI V^- (Figura R17, panel B). A continuación y utilizando los ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead, quisimos estudiar el efecto de la inclusión de partículas virales en ATIs en la diseminación del virus en el organismo infectado y en su transmisión entre ratones.

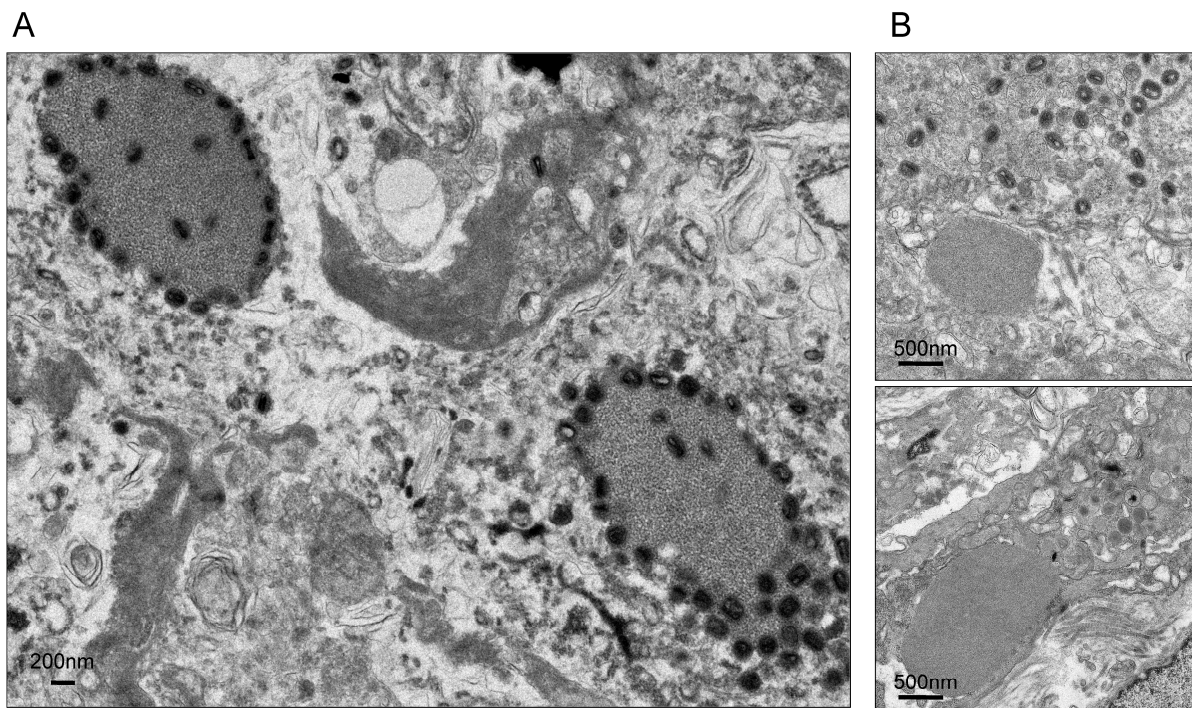


Figura R17. Formación de ATIs en bazos de BALB/c ratones infectados con ECTV-Hampstead y ECTV-Moscow. Microscopia electrónica de cortes de bazo de ratones infectados con 10^3 ufp con los aislados ECTV-Hampstead (A) y ECTV-Moscow (B) a los 4 dpi. (A) ATIs V^+ con IMV incluidos o adheridos a la superficie y (B) ATIs V^- encontrados en esplenocitos.

6.7.1. Diseminación de ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead en ratones BALB/c

Para analizar la diseminación de los virus desde el sitio de inoculación, se comparó la carga viral a 3, 5 y 7 dpi en ganglio poplíteo, bazo, hígado y pulmón de ratones infectados con 10 ufp de ECTV-Hampstead y de ECTV-Moscow (Figura R18).

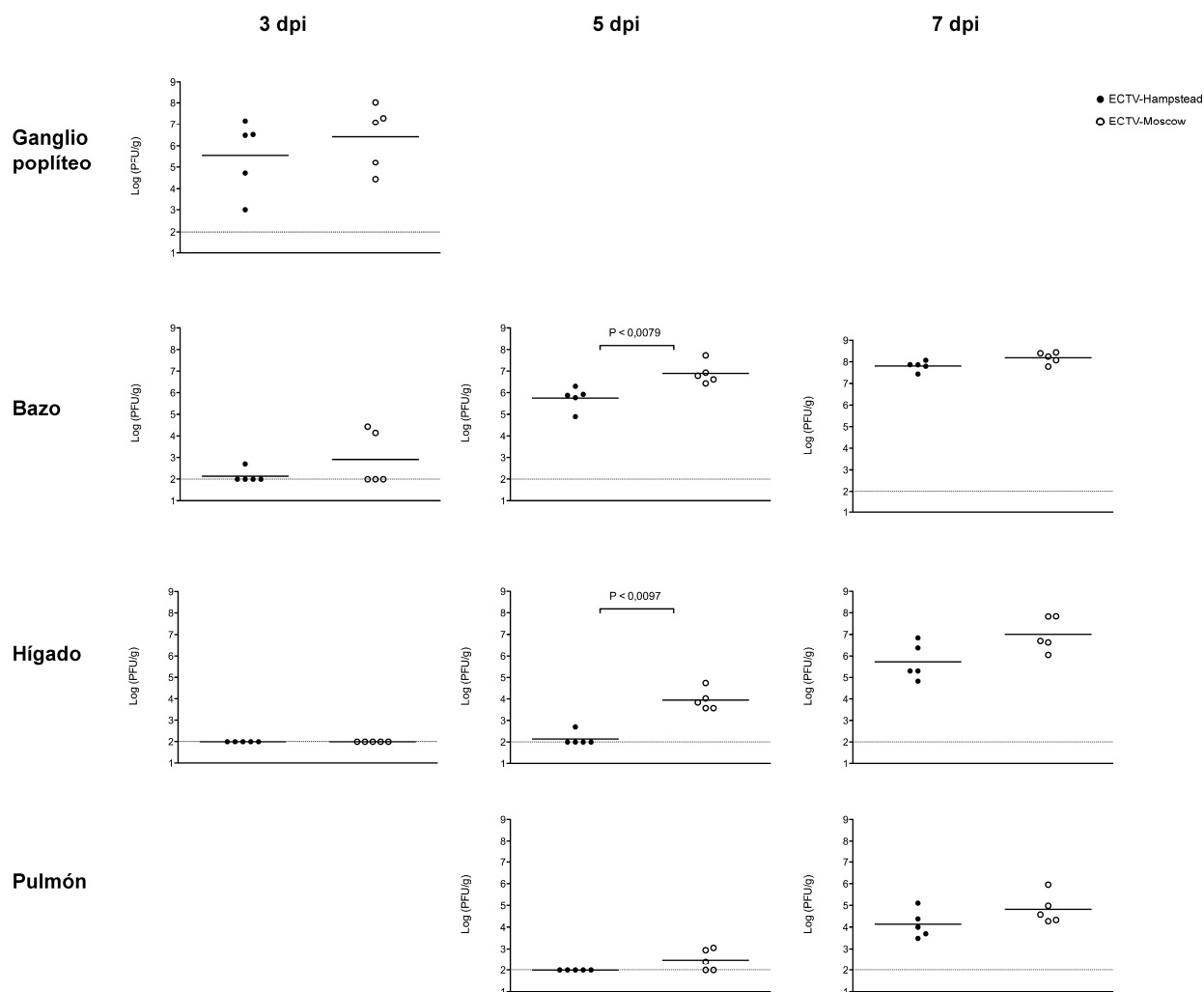


Figura R18. Carga viral en los órganos de ratones BALB/c infectados FP con ECTV-Hampstead y ECTV-Moscow. Se infectaron grupos de 5 ratones BALB/c con 10 ufp y se determinó el título viral en el ganglio poplíteo a 3 dpi, en bazo e hígado a los 3, 5 y 7 dpi y en el pulmón a los 5 y 7 dpi. Los círculos oscuros se corresponden con ECTV-Hampstead y los círculos blancos con ECTV-Moscow. Las barras indican la media geométrica de cada grupo y la línea discontinua el límite de detección.

A los 3 dpi se detectaron títulos virales altos en los ganglios poplíteos de ratones infectados con ambos aislados. Sin embargo, estos virus parecen no haber alcanzado el hígado y en el bazo se detectó virus infeccioso sólo en 2 de los 5 ratones infectados con ECTV-Moscow y en 1 de 5 para ECTV-Hampstead.

A los 5 dpi todos los ratones infectados presentaban títulos altos de virus en bazo, con aproximadamente 10 veces más ECTV-Moscow que ECTV-Hampstead. La diseminación a otros órganos como hígado o pulmón pudo ser detectada en la mayoría de los ratones infectados con ECTV-Moscow. Sin embargo, sólo un ratón infectado con ECTV-Hampstead presentaba carga viral en el hígado y ninguno en el pulmón. La diferencia de carga viral observada entre ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead fue estadísticamente significativa.

A los 7 dpi todos los ratones infectados con ambos aislados presentaban carga viral en bazo, hígado y pulmón. Si bien los títulos medios seguían siendo superiores en los ratones infectados con ECTV-Moscow, estas diferencias ya no eran estadísticamente significativas.

6.7.2. Transmisión de ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead entre ratones en contacto

Para estudiar la capacidad de transmisión de ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead desde un ratón infectado a un ratón sano, se infectaron ratones BALB/c vía FP con 10^3 ufp y, a diferentes dpi, dos de estos ratones se pusieron en contacto con 3-4 ratones sanos. Tras 3 d de convivencia en la misma jaula, los ratones sanos se aislaron y se esperó una semana para que el virus transmitido pudieran replicar y extenderse antes de diseccionarlos y analizar el título viral en el bazo. Se analizaron 3 grupos de animales con distintas ventanas de exposición: los ratones del grupo 1 habían compartido jaula con ratones infectados entre los días 2 y 5 pi; en el grupo 2 entre los días 4 y 7 pi; y en el grupo 3 entre los días 6-9 pi (Figura R19, panel A).

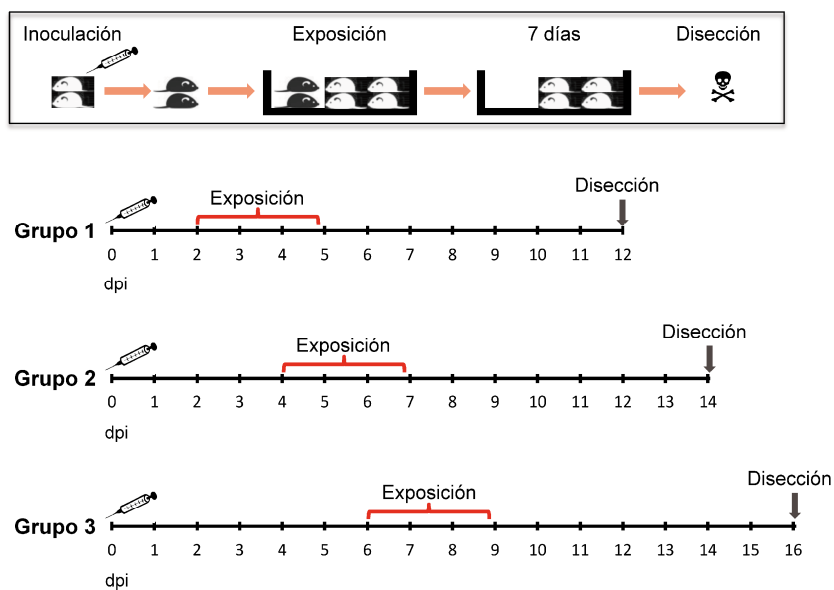
Los bazos de los ratones sanos del grupo 1 no presentan carga viral 7 días postexposición (dpe) a ratones enfermos. Por el contrario, la mayoría de los del grupo 3 presentan títulos altos en bazo, demostrando una transmisión eficaz de ambos virus a todos los ratones sanos expuestos a ratones enfermos. En el grupo 3 del experimento con ECTV-Moscow se encontró un ratón muerto a 7 dpe.

En el experimento de exposición entre los 4-5 dpi (grupo 2), 5 de 7 ratones que habían estado en contacto con ratones infectados con ECTV-Moscow presentaban títulos altos con una media de 10^5 ufp/g. En el caso de ECTV-Hampstead, sólo un ratón presentaba carga viral en bazo y esta era un orden de magnitud inferior (Figura R19, panel B). Esta diferencia es estadísticamente significativa. Finalmente, esta transmisión de ECV-Moscow resulta letal puesto que en un experimento independiente de transmisión en condiciones similares a las utilizadas para grupo 2, un 75% de los ratones sanos murieron antes de los 22 dpe (Figura R19, panel B).

6.7.3 Transmisión en ausencia de contacto

Con el fin de determinar si la inclusión de los viriones en ATIs afecta a la estabilidad de los virus fuera del cuerpo y a su capacidad de transmisión en ausencia de contacto directo entre ratones, se recogió el serrín sucio de ratones BALB/c infectados con 10^3 ufp de ECTV-Hampstead y ECTV-Moscow a los 6 dpi, y se mantuvo sin animales durante 6 d más. A este serrín se expuso un grupo de 5 ratones sanos durante 7 d antes de analizar la carga no detectando virus infeccioso en los bazos de ninguno de los ratones (datos no mostrados). Por lo tanto, no pudimos observar en estas condiciones experimentales una mejor transmisión del virus incluido en ATIs.

A



B

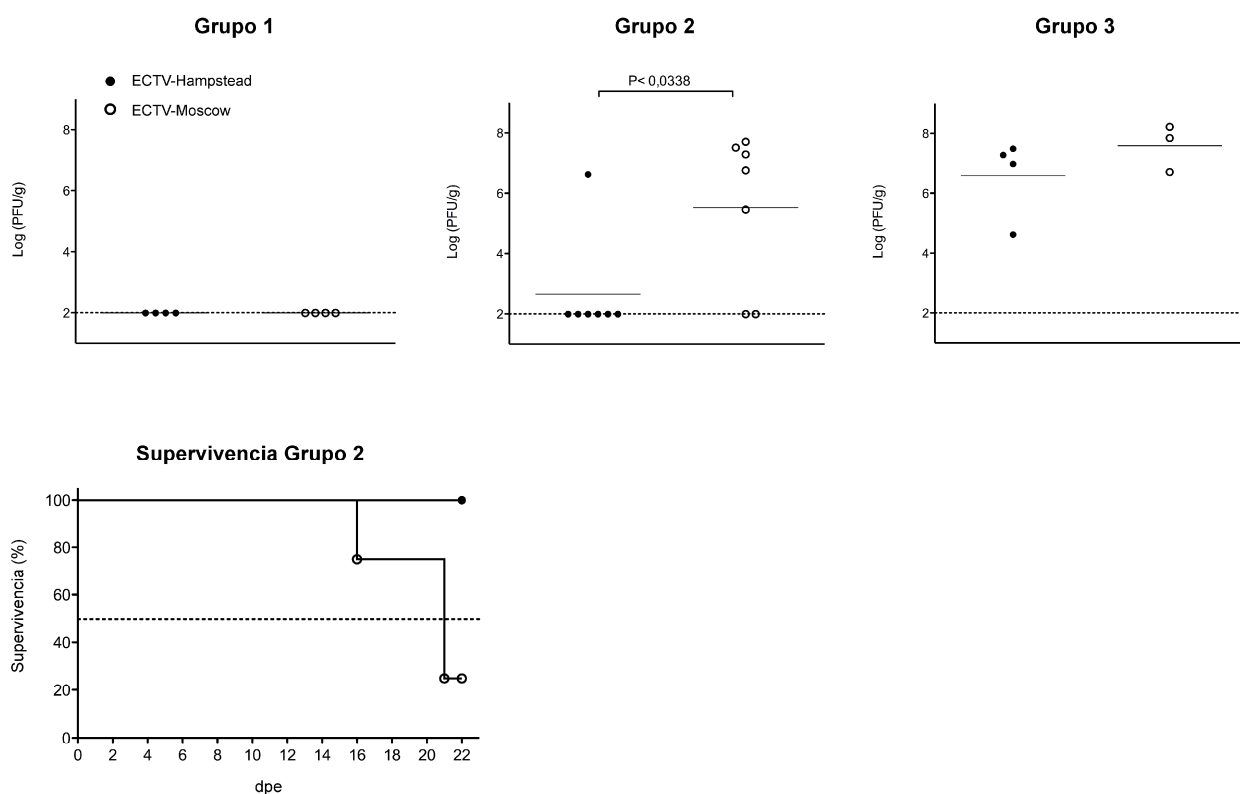


Figura R19. Transmisión de ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead desde un ratón BALB/c infectado a un ratón sano. (A) Esquema de transmisión con tres ventanas distintas de exposición entre 4 ratones sanos y 2 ratones infectados. 7 d después de finalizar la exposición, los bazos de los ratones se homogenizaron y el título viral se determinó por ensayo de placas de lisis. Las barras muestran la media geométrica de cada grupo y la línea discontinua el límite de detección. (B) En el grupo 2 se hicieron dos experimentos independientes con 3 y 4 ratones sanos y en los grupos 1 y 3 con 4 ratones sanos. (C) Se muestra el porcentaje de supervivencia de los ratones expuestos de forma similar al grupo 2 hasta 22 dpe.

6.8. Análisis de los aislados VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1

VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1, se aislaron en 1986 y 1988, respectivamente, de brotes en ratones de laboratorio en la Universidad de Varsovia, en Polonia y fueron descritos inicialmente como aislados de ECTV (Figura R1, Tabla MM1) (Faundez and Niemialtowski, 1990). Por este motivo, estos virus se incluyeron en este trabajo de comparación de aislados de ECTV.

6.8.1. Comparación de los genomas y relación filogenética

La pirosecuenciación (454-Roche) de los genomas purificados de VACV-WAU88-1 y VACV-WAU86 dio lugar a 28.072 lecturas para VACV-WAU88-1 y 117.669 para VACV-WAU86, con un tamaño medio por secuencia de 333 y 399 bp, respectivamente (Tabla R13). Más del 80% de las secuencias pudieron ser clasificadas como virales en VACV-WAU86, y un 66% en VACV-WAU88-1; el resto de las secuencias presentaban una distribución similar a la observada para los aislados de ECTV (Tabla R13). Las secuencias se mapearon contra los genomas de ECTV-Moscow, CPXV-BR y VACV-Cop. Solo en el *mapping* de ambos aislados contra el genoma de VACV-Cop se obtuvo el número menor de *contigs*, lo cual sugería que estos virus podrían pertenecer a la especie VACV. Tras un análisis filogenético preliminar (ver más adelante), se volvieron a mapear las secuencias contra el genoma de VACV-Lister generándose un único *contig* que no incluía las ITRs terminales. Éstas se recuperaron mediante ensamblaje *de novo*, como previamente se hizo con los genomas de los aislados de ECTV. Estos genomas presentaban un contenido alto en A+T (66,3%), característico de los OPVs (Tabla R13).

Tabla R13. Lecturas obtenidas por pirosecuenciación, su clasificación taxonómica y ensamblaje con Newbler.

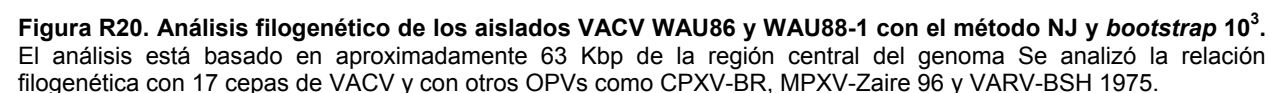
Aislado	Lecturas obtenidas	Tamaño medio (bp)	Distribución taxonómica (Blastx contra nr)				Lecturas mapeadas contra ECTV	Cobertura (x)	Tamaño genoma (bp)
			Desc.	Viral.	Bact.	Euc.			
VACV-WAU86	117.669	399	6.011 (5,1%)	99.039 (84,2%)	5 (0,004%)	68 (0,06%)	114.052 (98,1%)	242	187.677
VACV-WAU88-1	28.702	333	3.141 (10,9%)	19.035 (66,3%)	3.990 (13,9%)	31 (0,1%)	21.372 (77,3%)	51	187.671

Se muestra el número y porcentaje de secuencias clasificadas taxonómicamente por blastx contra la base de datos nr del genbank y mapeadas con el genoma de VACV-Lister. Desc: Desconocidas; Viral: Virales; Bact: Bacterianas; Euc: Eucariotas.

Tal y como se muestra en la Tabla R14 los dos genomas ensamblados se diferencian en 55 nt en 8 posiciones del genoma. De estos, 6 cambios caen en zonas intergénicas, y 2 afectan genes. De estas dos últimas posiciones, la primera es una delección de una base en un homopolímero que cambia la pauta de lectura del gen ortólogo a la B4R de VACV-Cop en el genoma de VACV-WAU88-1, truncando la proteína para la que codifica. Esta delección podría ser debida a un error de la secuenciación con 454-Roche, y no ha sido confirmada con la tecnología de Sanger. El segundo cambio, es una inserción de 23 nt (ACGGAGCAACCATGGATAAGACG) en el genoma de VACV-WAU88-1, que está presente en el genoma de VACV-Lister, y que cambia la pauta de lectura del gen ortólogo a B23R/C17L de VACV-Cop, dando lugar a una proteína con 29 aa adicionales (Tabla R14).

Posición en VACV-WAU86	Posición en VACV-WAU88-1	VACV-WAU86	VACV-WAU88-1	Gen ortólogo a VACV-Cop	Tipo de cambio en la proteína
2.887	2.887	4x(GAAAA)	1x(GAAAA)	-	-
9.660	9.666	8xT	7xT	-	-
84.919	84.905	8xT	9xT	-	-
157.778	157.765	8xA	9xA	-	-
168.662	168.650	8xT	7xT	B4R	Proteína truncada en VACV-WAU-88-1
168.830	168.817	-	T	B4R	Proteína truncada en VACV-WAU-88-1
175.042	175.030	8xT	7xT	-	-
183.776	183.743	-	Inserción de 23 bp (*)	C17R/B23R	Ad de 29 aa en VACV-WAU-88-1
184.766	184.776	4x(CTTTT)	1x(CTTTT)	-	-

Un análisis filogenético basado en 63 kbp de la región central conservada de los genomas de OPVs revela que estos aislados están estrechamente relacionados con los virus del grupo VACV-Lister (Figura R20). El alineamiento de los genomas de VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1 con VACV-Lister indicó que dos aislados presentan una delección de 701 bp en la posición 1.486 WAU86. En esta región de VACV-Lister se encuentra el pseudogen List002, que codifica para una versión truncada de CrmB. Además de esta delección, VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1 se diferencian de VACV-Lister clone107 en 536/534 nt y en 151/108 delecciones o inserciones.



6.8.2 Infección de ratones BALB/c con WAU88-1

Para analizar la virulencia del aislado VACV-WAU88-1 en ratones BALB/c, se infectaron vía IN grupos de 5 ratones hembras BALB/c de 6 semanas con 10^5 , 10^6 y 10^7 ufp de VACV-WAU88-1 y con 10^4 y 10^5 de VACV-WR monitorizando la progresión de la enfermedad durante 19 d (Figura R21). Se muestran sólo los datos de las dosis de más altas para ambos virus. Mientras VACV-WR causa la muerte de todos los ratones infectados con 10^5 ufp a 8 dpi, VACV-WAU88-1 no provocó la muerte, pérdida de peso o síntomas importantes de enfermedad en ninguno de los ratones infectados con 10^7 ufp, ni con las otras dosis utilizadas.

Pese a estar publicado como un aislado virulento de ECTV, los resultados presentados demuestran que VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1 son realmente aislados de VACV emparentados con la cepa Lister y que al menos VACV-WAU88-1 es un virus altamente atenuado en ratones BALB/c.

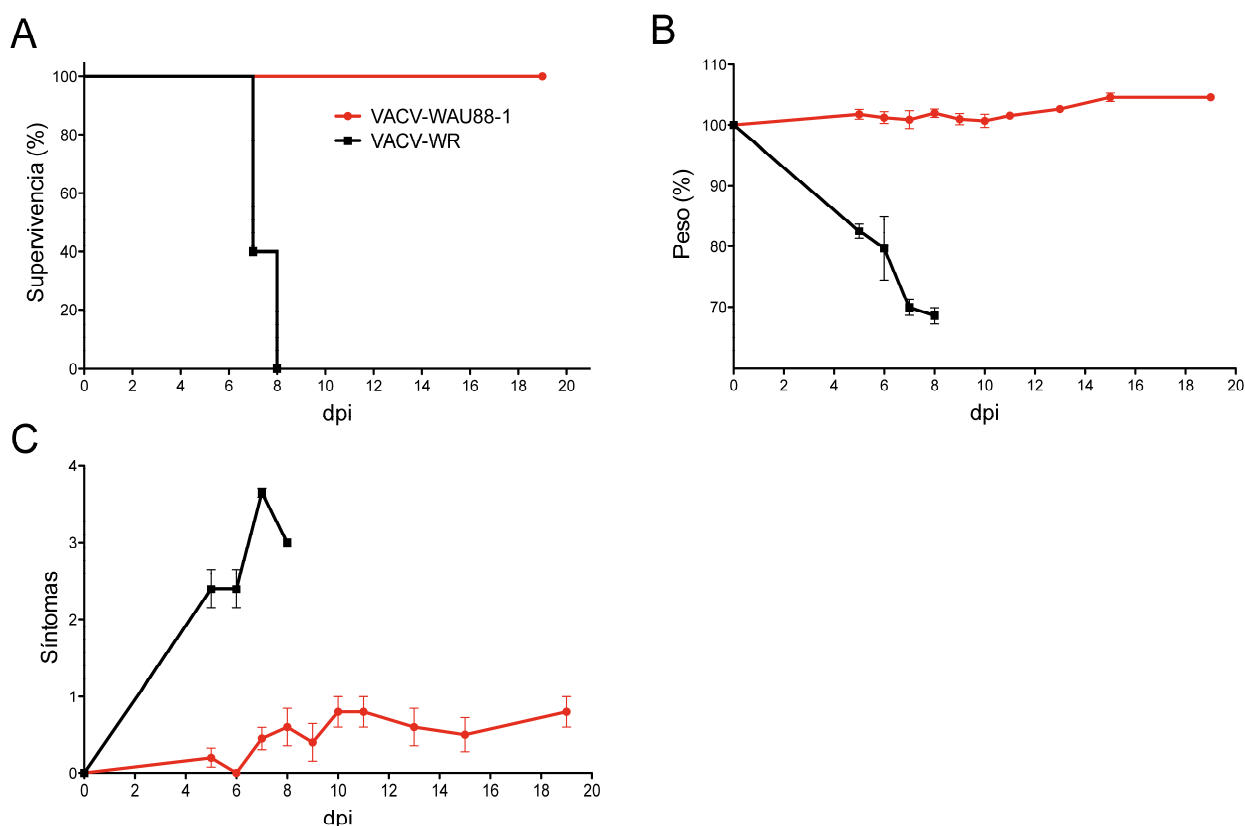


Figura R21. Virulencia de VACV-WR y VACV-WAU88-1 en ratones BALB/c infectados vía IN. (A) Se monitorizaron durante 20 d los grupos de 5 ratones infectados con 10^5 ufp de VACV-WR y 10^7 ufp de VACV-WAU88-1. Se muestra el porcentaje de ratones supervivientes a los 19 dpi, (B) la pérdida de peso y (C) la valoración de la enfermedad.

7 Discusión

Antes de su erradicación en 1980, VARV provocó una de las enfermedades más mortíferas a las que se ha enfrentado la humanidad, con una tasa de mortalidad de hasta el 30% en las estirpes más virulentas (Constantin et al., 2003). El estudio de la biología de este virus sigue siendo en la actualidad necesario para desarrollar nuevas herramientas terapéuticas y mejorar las vacunas disponibles frente a posibles zoonosis de poxvirus relacionados virulentos para el hombre o ataques bioterroristas con VARV (Smith and McFadden, 2002). Uno de los mejores modelos animales para estudiar los mecanismos de defensa frente a poxvirus y las estrategias de inmunoevasión de estos virus es *mousepox*, una enfermedad exantemática de ratón muy parecida a la viruela causada por ECTV (Buller, 2004). La secuenciación de genomas de distintas cepas relacionadas de un virus y el análisis de su capacidad infecciosa en un modelo animal es una aproximación ampliamente utilizada para definir los determinantes moleculares de virulencia y patogénesis. Hasta hace poco sólo se conocía la secuencia del genoma de ECTV-Moscow y ECTV-Naval, obtenidos por el método de Sanger (Chen et al., 2003). El desarrollo de nueva tecnología de secuenciación masiva ha facilitado enormemente la secuenciación de genomas de gran tamaño como los poxvirus, y el año pasado se determinó por pirosecuenciación 454-Roche el genoma de un tercer aislado, ERPV (Mendez-Rios et al., 2012). Aprovechando el potencial de estos equipos de nueva generación en esta tesis se han secuenciado los genomas de 12 aislados descritos como ECTV y comparado su virulencia en ratones BALB/c.

Los aislados de VARV, CMLV o ECTV se han obtenido directamente de su hospedador natural, sin que haya ocurrido un salto de especie (Davies et al., 1975; Esposito et al., 2006; Pfeffer et al., 1996). Esto representa una ventaja para el estudio de la evolución de las especies de OPVs con respecto a otros OPVs como VACV, cuyos aislados se han pasado en varios hospedadores distintos o extensivamente en cultivos celulares por la producción de las vacunas (Li et al., 2006b; Qin et al., 2011), o con respecto a CPXV y MPXV, que se han aislado de infecciones en hospedadores como el humano, mono o gato que no son su hospedador natural (Carroll et al., 2011; Chen et al., 2005; Hansen et al., 2009). Por el contrario, los aislados de ECTV que se conocen se han aislado desde brotes en ratones de laboratorio que, en muchos casos, se han podido contaminar por contacto directo con el reservorio natural de ECTV. Hasta los años 90 no se había introducido como medida de aislamiento el uso de *racks* ventilados y sellados, y por lo tanto la entrada en el animalario de roedores infectados que pudieran transmitir patógenos a los ratones de la colonia podía ocurrir (Lipman et al., 1999). En el caso de los brotes originados por sueros comerciales de ratón, como es el caso de ECTV-Cornell (Lipman et al., 2000), aunque no haya habido contacto directo entre ratón de campo y ratón de laboratorio, el virus presente en el suero procede de ratones que se han criado para la producción de suero y que en algún momento pueden haber contraído el virus de manera similar a la descrita anteriormente. Con la excepción de los aislados cuyos pases en cultivo están documentados (Fenner, 1949b); (Ichihashi and Matsumoto, 1966), pensamos que el resto de los aislados de ECTV que hemos secuenciado podrían ser aislados muy cercanos a los que circulan en el reservorio natural. Esta idea es coherente con el hecho de que el único aislado obtenido de un ratón de campo infectado en la naturaleza, ECTV-MouKre, está muy relacionado genéticamente con los aislados que provocaron brotes en animalarios de la misma región geográfica.

Los estudios de comparación de los genomas de varios aislados de VARV y CPXV han permitido establecer correlaciones entre los datos filogenéticos y los datos histórico-geográficos disponibles (Carroll et al., 2011; Li et al., 2007). Además en el caso de VARV, estas aproximaciones han permitido identificar posibles determinantes de virulencia (Esposito et al., 2006). En esta tesis doctoral, la secuenciación de aislados de ECTV nos ha permitido reconstruir sus relaciones filogenéticas, definir el origen de los brotes de los aislados y determinar genes que podrían estar implicados en la virulencia e inflamación producida por el virus.

7.1 Los aislados VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1

Los aislados VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1 se aislaron de dos brotes en colonias de ratones de laboratorio en 1988 y 1986 en la Universidad de Varsovia, Polonia (tabla MM1) (Faundez and Niemialtowski, 1990). Aunque estos virus fueron clasificados previamente como ECTVs, la secuenciación de sus genomas reveló que se trataba realmente de dos aislados prácticamente idénticos entre sí y relacionados con VACV. Así, un análisis filogenético basado en la región central conservada del genoma, mostró que estos virus están relacionados con el grupo de VACV-Lister, una de las primeras cepas vacunales usada durante la erradicación de la viruela. Para comprobar si estos virus pudieran ser variantes virulentas de VACV-Lister con capacidad de provocar brotes en animalarios infectamos ratones BALB/c por la vía IN con VACV-WAU88-1 que se había descrito como el aislado más virulento (Faundez and Niemialtowski, 1990). A diferencia de VACV-WR, descrito previamente como virulento (Brandt et al., 2005; Brandt and Jacobs, 2001), VACV-WAU88-1 no provocó la muerte de ningún ratón ni ningún síntoma que pudieran indicar progresión de la enfermedad. Este resultado pone en cuestión que estos virus fueran los verdaderos causantes de un brote en un animalario, y nos hace sospechar que pudieran ser una contaminación con un VACV-Lister del laboratorio durante su crecimiento en cultivos celulares. Además, VACV-Lister está muy atenuado en ratones BALB/c infectados por la ruta IN (Dr. Antonio Alcamí, comunicación personal), lo que es consistente con esta hipótesis. Un tercer aislado de poxvirus procedente de otro brote en el mismo animalario de la Universidad de Polonia no ha podido ser amplificado en cultivos celulares. Esto indica que podría ser un virus distinto a los dos aquí secuenciados y quizás el virus que realmente ocasionó el brote en animalario.

Los aislados polacos VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1 son casi idénticos, diferenciándose en solo 55 nt. El estudio filogenético los sitúa como los más diferentes entre las cepas descritas de VACV-Lister, constituyendo una nueva cepa de VACV-Lister. Este estudio apoya la gran diversidad descrita entre los VACV-Lister, que podría ser extensiva a otras cepas vacunales como Dryvax (Morikawa et al., 2005; Qin et al., 2011). La purificación de clones de stocks no purificados de VACV-Lister y de VACV-Dryvax y la secuenciación de sus genomas, han confirmado que estas cepas vacunales están formadas por una mezcla muy variada de genomas que difieren en numerosas posiciones. Así por ejemplo, se han identificado 573 polimorfismos y 53 inserciones/delecciones entre el clon 2 y 3 de VACV-ACAM, derivado de VACV-DryVax, y unos 1,200 polimorfismos entre los clones m8, mO, y LO de VACV-Lister. La comparación de 15 genomas procedentes de un vial de Dryvax utilizado para la vacunación contra la viruela, ha revelado la presencia de al menos 4 variantes distintas que difieren en inserciones o delecciones más drásticas (Garcel et al., 2000; Garcel et al., 2007; Garcel et al., 2009; Li et al., 2006a; Morikawa et al., 2005; Osborne et al., 2007; Qin et al., 2011). Esta diversidad se debe a que las vacunas

usadas en la campaña de erradicación se producían en gran cantidad en la piel de diferentes animales (Jacobs et al., 2009). La vacuna Dryvax, por ejemplo, se pasó entre 22-28 veces en piel de vaca (Rosenthal et al., 2001). Las estirpes vacunales crecidas se comenzaron a crecer en cultivo de células al final de la campaña mundial de erradicación de la viruela y apenas se utilizaron en la campaña de vacunación. Sólo desde los años 90 se ha empezado a purificar de placa las variantes vacunales y se han crecido en cultivos celulares en condiciones GLP (*Good Laboratory Practice*) por la introducción de normas sanitarias en la producción de vacunas (Paran and Sutter, 2009).

7.2 Problemas en la secuenciación, ensamblaje y la anotación de los genomas de ECTV

Los genomas de los aislados de ECTV se han secuenciado con una cobertura que oscila entre 32x para ECTV-Ishibashi y 404x para ECTV-Hampstead Egg, muy superiores al 3,7x de cobertura a la que se secuenció ECTV-Moscow (Chen et al 2003). A pesar de la profundidad con la que se han secuenciado estos genomas, en ningún caso pudimos obtener un único *contig* debido a la presencia de un número variable de repeticiones de una secuencia de 24 nt. Ni siquiera la secuenciación Sanger nos permitió resolver esta región y tuvimos que estimar su longitud por PCR y geles de agarosa. El origen de la variabilidad en el número de las repeticiones entre aislados no parece estar relacionada con el número de pases en cultivo puesto que, por ejemplo, ECTV-Hampstead Egg presenta menos repeticiones que ECTV-Hampstead. ECTV-Ishibashi el mismo número que ECTV-Moscow, y el aislado de campo ECTV-Mouk्रे el mayor número entre todos los aislados. También descartamos que sea un artefacto de la amplificación con la ADN polimerasa del fago Phi29, porque la secuencia obtenida por Sanger del genoma de ECTV-Moscow y de ECTV-Naval también presenta un alto número de repeticiones. Casi todos los productos de PCR tienen una especie de escalera formada por moléculas con un número menor de estas repeticiones de 24 nt. Las únicas excepciones se corresponden con los aislados que se han purificado por placa de lisis, sugiriendo que los aislados no purificados son realmente una mezcla formada por virus que contienen un número distinto de repeticiones. Probablemente la origen de esta variabilidad se debe a un “deslizamiento” de la ADN polimerasa viral en esta zona repetida durante la replicación. Curiosamente estas repeticiones afectan al gen EVM025 determinando la presencia de un número también variado de repeticiones de la secuencia peptídica “DIDNGIVQ”. La acumulación de estas repeticiones a partir del aminoácido 21 de la proteína llevó, en la primera anotación de ECTV-Naval, a anotarlo como pseudogen. Sin embargo, la región N-terminal es muy flexible y los primeros 15 aa de F1 son responsables de interaccionar e inhibir la caspasa C9. Esto sugiere que la introducción de más o menos repeticiones de la secuencia de 8 aa en posición 21, como también ocurre en el ortólogo de CPXV, no debería afectar a su función (Yu et al., 2011). Por lo tanto, en la anotación nueva de ECTV-Naval, esta ORF aparece como gen y no como pseudogen.

Un segundo problema técnico de la secuenciación han sido los homopolímeros de A/T. El problema en la determinación de los homopolímeros es intrínseco de la pirosecuenciación (454-Roche), ya que la quimioluminiscencia que se produce durante la reacción de secuenciación es captada por un sensor que no es capaz de distinguir el número exacto de nt cuando se aparecen más de 5-6 nt idénticos seguidos (Huse et al., 2007; Qin et al., 2011). La secuenciación por Sanger de todas aquellas posiciones

de homopolímeros que eran dudosas por alterar la pauta de algún gen, nos permitió discernir entre verdaderos pseudogenes y genes, y detectar un sesgo general consistente en subestimar el número de A/Ts en los homopolímeros. Los posibles errores en homopolímeros que se encuentran en zonas intergénicas no se han confirmado por PCR y secuenciación. El método de secuenciación por síntesis de Illumina, utilizado para resecuenciar ECTV-Naval no presenta este importante problema, es más económico y proporciona una mayor cobertura. Por esto, aunque no lo hemos utilizado en este trabajo para secuenciar todos los aislados, es una tecnología idónea para este tipo de estudios.

Un tercer problema deriva de la decisión de anotar un gen como tal o como pseudogen. Un ejemplo de este problema lo tuvimos a la hora de decidir si los ortólogos a los genes EVM006 y EVM007 de ECTV-Moscow se deberían considerar genes o no. Estos dos genes en realidad son los fragmentos de un gen lectina de tipo C que se conserva sólo en el aislado CPXV-Germany 91-3 y en el aislado ECTV-Mill Hill. Para la versión entera no se ha demostrado todavía función, pero sí para el gen CPXV012 de CPXV-BR que expresa una versión truncada capaz de regular negativamente la presentación de MHC-1 (Alzhanova et al., 2009). Sin embargo, la proteína truncada de ECTV-Moscow no parece afectar a la expresión de MHC-1. Por ello, decidimos anotar la versión larga de ECTV-Mill Hill como gen, y la de todos los otros ECTV como fragmentos de un único pseudogen.

7.3 Crecimiento *in vitro* de los aislados

El análisis *in vitro* de la progresión de la infección y de la formación de placas de lisis de los aislados de ECTV indica que estos virus son capaces de infectar y replicar eficazmente células BS-C-1. Esto coincide con el alto grado de conservación de los genes esenciales en todos los aislados de ECTV y descarta que la atenuación de la virulencia *in vivo* de los aislados ECTV-Hampstead Egg, ECTV-Ishibashi y ECTV-Mill Hill sea debida a un defecto en las etapas básicas del ciclo de vida del virus. En el caso particular de ECTV-Mill Hill, la progresión en cultivos es ligeramente más lenta que la del resto de los aislados, si bien en un ciclo único de infección ECTV-Mill Hill es capaz de producir un título viral comparable con el de los otros aislados atenuados y virulentos.

En varios experimentos independientes se pudo observar que ECTV-MP5 progresaba más rápidamente en cultivo, alcanzando títulos virales más altos a las 48 y 72 hpi. Además, en un ensayo de ciclo único de infección, ECTV-MP5 y ECTV-MP1 alcanzaban títulos más altos con respecto a los otros aislados a las 7 y 11 hpi. Curiosamente, la morfología de placa de lisis de estos dos virus es distinta a la de los otros aislados. A las 96 hpi, las células que rodean las placas de lisis de los aislados ECTV-MP5 y ECTV-MP1 están fusionadas formando sincitios. Se ha descrito que las proteínas A17 y A27 de VACV están involucradas en la formación de sincitios en cultivo a pHs ácidos (Kochan et al., 2008). Sin embargo, los genes que codifican para las proteínas ortólogas se encuentran muy conservados entre todos los aislados. El único gen que diferencia a ECTV-MP5 y ECTV-MP1 de los demás aislados de ECTV es EVM5-115/EVM1-115, ortólogo de EVM097 en ECTV-Moscow. Aunque estas proteínas presentan sólo uno o dos cambios de aminoácidos, podrían estar involucradas en la formación de sincitios ya que su ortólogo en VACV-Cop, la proteína D8, es una proteína estructural de la envuelta implicada en la unión a GAGs de la superficie celular (Hsiao et al., 1999). La región N-terminal de esta proteína D8 presenta homología con una anhidrasa carbónica celular (EC 4.2.1.1) que cataliza la

conversión del bicarbonato en agua con la liberación de un protón (Maa et al., 1990; Ohradanova et al., 2007). El cambio individual de los residuos en las posiciones 69 y 92 de la proteína D8 por residuos de histidina modifica su actividad de anhidrasa carbónica, y la mutación doble (Y69H, Y92H) aumenta dos órdenes de magnitud la producción viral *in vitro* (Ohradanova et al., 2007). Pese a que las mutaciones que presenta la proteína ortóloga a D8 en ECTV-MP1 (H67R, S206-) y ECTV-MP5 (N175K) no coincidan con los residuos descritos, no descartamos que estos cambios pudieran ser igualmente responsables de una mayor actividad de esta proteína, acidificando el pH de la célula y de la consiguiente formación de sincitios mediada por las proteínas A17 y A27 (Kochan et al., 2008).

La mejor capacidad de progresar en cultivos celulares, la producción de más partículas virales infecciosas en un ciclo único de infección, y la capacidad de formar sincitios no se traducen en una mayor virulencia de ECTV-MP5 *in vivo*.

7.4 Genes de ECTV candidatos a virulencia y patogénesis

Los genomas de ECTV presentan una alta conservación en la región central del genoma, como se ha descrito en general para todos los poxvirus (Lefkowitz et al., 2006). Este resultado es lógico ya que en esta región se encuentran codificados genes esenciales para el virus (genes de transcripción, replicación, estructura y morfogénesis) (Lefkowitz et al., 2006). Por el otro lado, los genomas de ECTV presentan una tendencia a acumular mutaciones en las regiones de los extremos del genoma que codifican para genes involucrados en evasión inmune y virulencia.

Los aislados de ECTV que se han atenuado por sucesivos pases en cultivos celulares o CAMs, han conservado los genes implicados en replicación o morfogénesis y han perdido, en diferente medida, algunos genes de los extremos del genoma que están implicados en la modulación del sistema inmune. En este sentido, resulta interesante observar una tendencia general a perder la funcionalidad de proteínas de tipo anquirina (1 en ECTV-Ishibashi, 2 en ECTV-Mill Hill y 4 en ECTV-Hampstead Egg). ECTV-Hampstead Egg, además, presenta truncado un gen que codifica para una proteína de tipo kelch (ortólogo de EVM004). A lo largo de la evolución que ha dado lugar a los distintos aislados naturales de ECTV, se ha debido repetir este proceso numerosas veces puesto que muchos de los pseudogenes de ECTV son fragmentos de genes anquirina y kelch que derivan de un ancestro parecido a CPXV que tiene todos estos genes intactos. VARV y ECTV presentan la misma tendencia a perder genes anquirina y kelch respecto a CPXV y VACV (CP77/CHOr, K1L) (Shchelkunov, 2012). Se ha especulado que estas proteínas interaccionan juntas en un sistema complejo determinando en CPXV su amplio rango de hospedador (Shchelkunov, 2010, 2012). Así, la pérdida de estos genes podría ser el resultado de un proceso evolutivo hacia la especialización a un hospedador. En ECTV-Hampstead Egg la pérdida de todos estos genes ha sido el resultado de su adaptación en las CAMs, al igual que VACV-CVA y VACV-MVA, y la cepa atenuada FP9 del virus *fowlpox* que por pases en CAMs y adaptación en cultivos han perdido especialmente genes que codifican para proteínas de tipo anquirina (Laidlaw and Skinner, 2004; Meisinger-Henschel et al., 2007).

La pérdida de genes con dominios anquirina o kelch se ha asociado con atenuación. Por ejemplo, en MYXV se han descrito tres proteínas anquirinas, M-T5, M148 y M149, cuya delección afecta a la virulencia del virus, y una de ellas, M148, podría estar implicada en el bloqueo de la inflamación en conejo (Blanié et al., 2009; Mossman et al., 1996). La delección de genes con dominios kelch también afecta a la

virulencia *in vivo* de CPXV y ECTV (Kochneva et al., 2005; Kochneva et al., 2009). También se ha descrito la presencia de uno o más genes que codifican para proteínas kelch/BTB cuya pauta de lectura está alterada en cepas atenuadas de los virus *sheeppox*, *goatpox* y *lumpy skin disease* (Kara et al., 2003; Tulman et al., 2002).

La importante delección de genes que presenta ECTV-Hampstead Egg incluye genes que codifican para el CD30 viral, una proteína que presenta dominio SECRET, VGF y semaforina. Curiosamente, la pérdida de este último gen se ha descrito también en VACV-CVA y VACV-MVA (Antoine et al., 1998). Su ausencia en el genoma de un virus altamente atenuado les postula como candidatos para ser determinantes de virulencia.

ECTV-Mill Hill presenta truncado el gen que codifica para la vCKBP 35K y dos genes que codifican para proteínas tipo anquirina (EVM165 y EVM010). Las cepas VACV-WR y VACV-Cop presentan truncado el gen que codifica para la vCKBP 35K (Alcamí et al., 1998). La introducción de una versión intacta del gen procedente de VACV-Lister en el genoma de VACV-WR reduce su virulencia y la respuesta inflamatoria posiblemente al interferir con la quimiotaxis de los macrófagos al sitio de infección, en este caso el pulmón (Reading et al., 2003). Del mismo modo, la ausencia de expresión de vCKBP 35K en ECTV-Mill Hill podría ser responsable de la fuerte inflamación temprana de la pata. El gen EVM165, al igual que su ortólogo de VACV, codifica para una proteína anquirina/F-box que interacciona con la vía del ubiquitina proteasoma, y podría estar implicado en asegurar una replicación eficaz del virus que podría ser responsable de su virulencia (Sperling et al., 2008; van Buuren et al., 2008b). Finalmente, no se conoce aún la función del gen EVM010. La atenuación de ECTV-Mill Hill puede ser debida a la falta de expresión de cualquiera de los tres genes mencionados o a un efecto combinado de todos ellos. Así que sólo la delección individual de cada uno de ellos podría revelar su grado de participación en la atenuación de ECTV-Mill Hill.

En ECTV-Ishibashi, el único gen que se encuentra truncado es EVM002 y podría ser responsable de su fuerte atenuación *in vivo*. Este gen codifica para una proteína de tipo anquirina que se ha implicado en el bloqueo de la señalización intracelular de NF- κ B (Rubio et al., Cell Host Microbe 2013 in press). Los ratones infectados con ECTV-Ishibashi presentan una inflamación importante de la pata que comienza a los 4 dpi y que acaba provocando necrosis y mutilación de la misma. El bloqueo de la señalización intracelular de NF- κ B producido por EVM002 inhibe la producción de moléculas pro-inflamatorias y su ausencia podría explicar la fuerte inflamación de la pata de ratones infectados con ECTV-Ishibashi (Rubio et al., Cell Host Microbe 2013 in press). Esta pérdida de la extremidad como resultado de un proceso inflamatorio excesivo recuerda las “tormentas de citoquinas” desencadenadas por algunos virus, como VARV, citomegalovirus o el virus de la gripe aviar H5N1, que consisten en respuestas inflamatorias tan fuertes y descontroladas que llegan a ser letales (Barry et al., 2000; Jahrling et al., 2004; Tisoncik et al., 2012; Yuen and Wong, 2005). La pérdida de la pata provocada por ECTV fue una de las característica más llamativas de la enfermedad *mousepox*. Se observó por primera vez en ratones de 3 semanas con ECTV-Hampstead y de ahí deriva el nombre Ectromelia (Groppel, 1962). En nuestros experimentos en ratones BALB/c, este virus provocó una inflamación a los 8-9 dpi con dosis altas pero en ningún caso la pérdida de la pata. Esto puede estar relacionado con la mayor edad de los ratones empleados en esta tesis.

La inflamación de la pata producida en respuesta a la infección con ECTV-Mill Hill, al igual que la que provoca ECTV-Hampstead Egg, ocurre 1-2 d después de la que provoca la infección con ECTV-Ishibashi. Además esta inflamación se resuelve con la aparición de grandes costras y la recuperación completa de la extremidad al final del experimento. Esto podría indicar que EVM002, además de ser un determinante en la virulencia de ECTV, es un fuerte modulador anti-inflamatorio, incluso más potente que EVM001, la vCKBP 35K que une e inhibe la acción de las quimioquinas, y cuya ausencia en ECTV-Mill Hill cursa con una inflamación menos agresiva causada por ECTV-Mill Hill.

La infección con los aislados virulentos ECTV-Moscow, ECTV-Naval y ECTV-Cornell no induce inflamación temprana porque expresan varios factores anti-inflamatorios como EVM002 y CrmD (Alejo et al., 2011; Alejo et al., 2006); Rubio et al., Cell Host Microbe 2013 in press). Resulta interesante que pese a que ECTV-Hampstead y ECTV-Moscow presentan una batería idéntica de genes con potencial antiinflamatorio, sólo ECTV-Moscow es capaz de frenar la respuesta inflamatoria en la pata. En este punto cabe subrayar que todos los aislados de ECTV presentan gran variabilidad en el gen EVM025 que codifica para un ortólogo de la proteína F1 de VACV. Esta proteína se ha descrito como inhibidor de la caspasa C9 y recientemente como un potente inhibidor del inflammasoma (Gerlic et al., 2013; Yu et al., 2011). Esta variabilidad se debe a la acumulación de repeticiones de 8 aa en la región N-terminal que en ECTV-Naval son 17, en ECTV-Hampstead 19, en ECTV-Moscow 28 en ECTV-Cornell 45 y en ECTV-Moukre son 63, y no parece afectar a su estructura tridimensional, ni alterar la capacidad de bloqueo de la respuesta inflamatoria en el hospedador (Yu et al., 2011). En este sentido, un número elevado de repeticiones no parece afectar negativamente a la función de este gen entre los ECTV, puesto que ECTV-MouKre es el que más repeticiones presenta y el único entre los virus del subclado centroeuropeo capaz de bloquear la inflamación de la pata.

La comparación de los genomas de los aislados centroeuropeos nos ha llevado a proponer tres genes con más de dos aa diferentes como posibles inhibidores de la respuesta inflamatoria en ECTV. Estos genes codifican por proteínas con diferencias entre ECTV-Moukre que bloque eficazmente la inflamación de la pata y los aislados ECTV-MP1, ECTV-MP4 y ECTV-MP5 que no lo hacen.

El primero, EVMK017 (EVM011), codifica para una proteína ortóloga a C10 de VACV-Cop, y se ha especulado que podría tener una función como antagonista de IL-1 (Kluczyk et al., 2002). Pese a que la actividad anti-IL-1 de la proteína completa C10 no se ha demostrado aún, se ha visto que péptidos sintéticos de las posiciones 316–327 de esta proteína actúan como antagonistas de IL-1 interaccionando con su receptor celular (Kluczyk et al., 2002). Además, péptidos con variaciones en las posiciones 318–320 presentan una actividad inmunosupresora mayor que los péptidos con secuencia salvaje (Kluczyk et al., 2002). Curiosamente, EVMK017 presenta cinco aa distintos con respecto a todos los demás aislados de ECTV (T316Y, V317S, F318I, N319S, F320R) y estos aa coinciden exactamente con los péptidos antagonistas de IL-1 de su ortólogo en VACV (Kluczyk et al., 2002). Esto nos hace pensar que el cambio en estos residuos podría permitir a EVMK017 interaccionar de manera más eficaz con el receptor celular de IL-1 potenciando su función anti-inflamatoria.

El segundo, EVMK038 (Región N en ECTV-Moscow), codifica para una proteína ortóloga a K4 de VACV-Cop con actividad ADNasa de corte y unión (Eckert et al., 2005) y cierta similitud con la fosfolipasa D (Cao and Koop, 1997). ECTV-MouKre es el único entre los aislados del subclado

centroeuropeo en presentar una versión completa de esta proteína similar a la de VACV-Cop. La actividad fosfolipasa D da lugar a ácido fosfatídico, que es un mediador necesario para la quimiotaxis y la activación de los neutrófilos (Gomez-cambronero, 2011). Sin embargo, se ha demostrado que K4 carece de actividad de fosfolipasa *in vitro*, y su delección no altera ni el tamaño de las placas de lisis ni la virulencia del virus *in vivo* (Blasco and Moss, 1991; Eckert et al., 2005; Sung et al., 1997). Por otro lado, otros aislados de ECTV que inducen una fuerte inflamación de la pata como ECTV-Hampstead Egg y ECTV-Mill Hill también presentan una versión completa de EVMK038, cuestionando un posible papel de EVMK038 como modulador de la inflamación *in vivo* de ECTV-MouKre.

El tercero, EVMK199 (EVM169), codifica para la proteína más grande de los OPVs con aproximadamente 2.000 aa y con función desconocida (Meyer et al., 2005). Esta proteína, ortóloga de B22 en VARV, en ECTV-Moukre presenta una delección interna de 40 aa y tiene un dominio transmembrana C-terminal conservado entre los ChPV a excepción de VACV (Meyer et al., 2005). La posible implicación de los genes EVMK17 y EVMK199 en silenciar la inflamación de la pata de ratones infectados con ECTV-Moukre coincide con el hecho de que un aislado atenuado del virus *fowlpox* presenta truncados, entre otros, los genes ortólogos a EVMK017 y EVMK199 (Laidlaw and Skinner, 2004). A diferencia de ECTV-MP1, ECTV-MP5 no causa una inflamación importante en la pata de los ratones infectados a bajas dosis (1 y 10 ufp). Una de las diferencias más importantes en el contenido de proteínas de estos virus afecta, de nuevo, a los genes ortólogos de EVM169, que se diferencian curiosamente en la misma región de la proteína que se encuentra mutada en ECTV-Moukre.

La comparación de los genomas y del comportamiento *in vivo* de varias cepas de ECTV nos ha permitido identificar una serie de proteínas codificadas en el genoma de ECTV como potenciales determinantes de virulencia o con posibles propiedades antiinflamatorias.

7.4.1 Papel de los ATIs *in vivo*

La mayoría de los aislados de CPXV, virus *canarypox*, virus *volepox*, virus *fowlpox* y virus *raccoonpox* forman ATIs en las células infectadas e incluyen los viriones generados en ellos (Ichihashi and Matsumoto, 1966; (Marchal, 1930; Randall et al., 1964). Por el contrario, VACV, VARV, MPXV y CLMV expresan una versión truncada de la proteína ATIp y por lo tanto no son capaces de producir ATIs. El aislado CPXV-BR y todos los aislados de ECTV, a excepción de ECTV-Hampstead, expresan una versión truncada de la proteína P4c lo que impide a sus IMV incluirse en los ATIs (fenotipo V⁻) (Amegadzie et al., 1992b) (Meyer and Rziha, 1993). Es curioso el comportamiento completamente opuesto de CPXV y ECTV en lo que se refiere a los ATIs. Por un lado, todos los CPXV, con la excepción del aislado CPXV-BR, conservan la capacidad de formar los ATIs y de incluir las partículas virales en ellos (Carroll et al., 2011). Esto ocurre incluso con el virus CPXV-No-H2 que se aisló de una infección en humano y que es un recombinante natural entre CPXV y ECTV (Okeke et al., 2012). Por otro lado la mayoría de los ECTV han truncando, de al menos tres formas distintas, el gen que codifica para P4c.

Para averiguar más acerca del papel que juegan los ATIs durante la infección por poxvirus, hemos utilizado dos virus casi idénticos, ECTV-Hampstead con fenotipo V⁺ y ECTV-Moscow con fenotipo V⁻, en un modelo de infección en ratón. Estos virus, además de diferenciarse en la proteína P4c, intacta en el primero y truncada en el segundo, se diferencian en otras tres proteínas. En dos de ellas,

presentan un cambio conservativo de un solo aa, mientras que en la tercera, ortóloga de la proteína F1 de VACV-Cop, contiene un número de repeticiones distinto de un péptido de ocho aa, que, por otro lado, es diferente entre todos los ECTV. Si asumimos que estos tres cambios no son relevantes en virulencia o patogénesis, la comparación de estos dos virus en infecciones de ratón podría darnos pistas acerca de la función que tiene la inclusión de los IMVs en los ATIs.

Los resultados obtenidos indican que la inclusión de partículas virales en ATIs como hace ECTV-Hampstead podría reducir la DL_{50} y provocar una infección no dependiente de dosis con mayor número de muertes en ratones infectados con dosis inferiores. Esta ausencia de una muerte dosis-dependiente se ha observado en dos experimentos independientes con resultados similares y no parece que sea debido a un problema de inoculación porque la inflamación de la pata ocurre antes cuanto mayor es la dosis del inóculo utilizada. La inclusión de los IMVs en los ATIs podría ser también responsable de una peor diseminación del virus dentro del hospedador, por la difícil liberación de los IMVs desde la matriz proteica del ATI. Esto explicaría una diseminación más lenta de ECTV-Hampstead en los tejidos del hospedador, comparado con ECTV-Moscow. Tras la infección vía FP de ratones BALB/c, ambos virus alcanzan el ganglio, con títulos similares a los 3 dpi indicando que la inclusión en ATIs no supone ni una ventaja ni un inconveniente para la diseminación inicial desde el sitio de infección. Sin embargo, la diseminación posterior a órganos internos como hígado y bazo ocurre más lentamente en ECTV-Hampstead que en ECTV-Moscow.

Se ha propuesto que los ATIs, por su gran tamaño, podrían ser fagocitados por macrófagos, facilitando la liberación de los IMV al degradar la matriz proteica de los ATIs (Ulaeto et al., 1996). Una mayor presencia de macrófagos al sitio de infección debido a los ATIs podría explicar la inflamación de la pata causada por la infección con ECTV-Hampstead. Posteriormente, los IMVs podrían escapar a la degradación de los lisosomas a través de sus proteínas de membrana A17-A27 que tienen capacidad fusogénica a pH ácido (Ulaeto et al., 1996; Kochan et al., 2008). Quizás la captación de los ATIs por los macrófagos sea un mecanismo de entrada en el organismo muy inespecífico facilitando la transmisión entre hospedadores distintos. Esto encaja con el amplio rango de hospedador de CPXV que se incluye en ATIs, y con la pérdida de esta capacidad en virus especializados en un único hospedador como VARV o ECTV (McFadden, 2005). En este sentido, ECTV y VARV son patógenos muy virulentos y la enfermedad que producen es letal a bajas dosis. En cualquier caso, la inclusión de viriones en ATIs en ECTV no parece que contribuya a una mejor dispersión o a una mayor virulencia a tenor de los resultados que hemos obtenido con ECTV-Hampstead.

Se ha demostrado que P4c es una proteína específica de los IMV y que por lo tanto, está ausente de las membranas de IEVs, CEVs y EEVs (Ulaeto et al., 1996). Además su conservación en OPV como VARV, que no expresan una ATIp funcional y no producen ATIs, sugiere que P4c podría jugar algún papel adicional en morfogénesis (McKelvey et al., 2002). La retención de la progenie viral como IMVs puede parecer contraproducente para el virus, ya que se ha descrito que los EEVs son más eficaces en la diseminación dentro del hospedador (van Eijl et al., 2002). Sin embargo, puesto que los IMVs son partículas más resistentes, quizás no hay que descartar la posibilidad de que la inclusión de los IMVs en los ATIs constituya un mecanismo de transmisión del virus entre hospedadores (van Eijl et al., 2002; McKelvey et al., 2002). En relación a esta posibilidad, hemos encontrado una ventana de

exposición de 4-7 dpi en la que ECTV-Hampstead se transmite peor a ratones sanos con los que han compartido jaula que ECTV-Moscow. Por lo tanto, la inclusión de los IMVs en los ATIs no sólo no supone una ventaja en la transmisión entre ratones, sino que claramente la dificulta. Se podría argumentar que en la ventana de 4-7 dpi se había observado anteriormente una mayor carga viral en los ratones infectados con ECTV-Moscow y esta es la razón de la mejor transmisión. Sin embargo, en el experimento de diseminación, los ratones se infectaron con una dosis dos órdenes de magnitud inferior a la utilizada en el experimento de transmisión. Así que pensamos que quizás, a la dosis utilizada para la transmisión, los ratones infectados con ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead presenten una carga viral más comparable. Este experimento demuestra que los ATIs no representan una ventaja para el virus en su transmisión entre hospedadores de la misma especie. Estos resultados corroboran trabajos pioneros realizados en 1949 por Fenner que demostraban una mejor transmisión por contacto desde ratones infectados con ECTV-Moscow que desde ratones infectados con ECTV-Hampstead (Fenner, 1949b). Estos experimentos se realizaron con ratones outbred multicolor que se exponían 24 h a ratones en un estado avanzado de infección (11 dpi) y con síntomas evidentes de enfermedad. Por el contrario, en nuestros experimentos con una ventana de exposición similar (6-9 dpi) no detectamos diferencias en su capacidad de transmisión, lo que puede estar relacionado con el uso de diferentes cepas de ratón.

También se ha propuesto que los ATIs representen un mecanismo de protección de los virus en el ambiente cuando los hospedadores son escasos o en condiciones ambientales adversas, prolongando el tiempo en el que el virus puede transmitirse e infectar un animal (Buller and Palumbo, 1991). Algunos virus que infectan insectos presentan un mecanismo parecido. Los entomopoxvirus, de la familia *Poxviridae*, se incluyen en estructuras proteicas, muy similares a los ATIs de los OPVs, llamadas esférulas, que sirven a la supervivencia del virus en el ambiente (Banville et al., 1992; Mitsuhashi et al., 2013). Estas esférulas son muy parecidas a las masas proteicas en las que se engloban los baculovirus y que les mantienen en las hojas y, una vez ingeridas en el intestino de los insectos, se disuelven liberando una gran cantidad de viriones infecciosos (Friesen, 2007). Esta hipótesis no se pudo demostrar experimentalmente en el caso de ECTV, si bien sólo hemos empleado una única condición. Este experimento se debería repetir cambiando muchos parámetros, como la ventana de infección de los ratones cuyo serrín se utiliza como vehículo de transmisión, el tiempo de exposición al serrín u otras variables.

Es probable que en la naturaleza existan otros ECTV, además de ECTV-Hampstead, que presenten fenotipo ATIs V^+ y que no hayan causado brotes en animalarios por su peor transmisión entre ratones. Dicho de otro modo, los ECTV con fenotipo V^- podrían presentar una ventaja a la hora de transmitirse a ratones de animalario. Es posible que ECTV-Hampstead haya podido ocasionar el brote histórico de ECTV observado por Marchal al tratarse de ratones jóvenes, con un sistema inmune inmaduro, y por lo tanto más susceptibles a la infección (Marchal, 1930).

Los resultados de nuestros experimentos parecen indicar que la inclusión en los ATIs representan una desventaja para el virus porque ralentiza su dispersión dentro del organismo y dificulta su transmisión entre hospedadores. Sin embargo, también podría tratarse de un mecanismo de contención de la virulencia del patógeno, asegurando la supervivencia de su hospedador y por lo tanto su persistencia en la naturaleza.

7.5 El origen de los aislados de ECTV

Un análisis filogenético de la región conservada de los genomas de ECTV nos ha permitido agrupar a todos los aislados en dos clados, uno europeo y uno asiático. El primero comprende los tres aislados atenuados ECTV-Ishibashi, pasado en cultivos celulares, y ECTV-Hampstead Egg y ECTV-Mill Hill, pasados por CAMs; cinco aislados procedentes de brotes en colonias de ratones de laboratorio (ECTV-Hampstead, ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5, ECTV-Moscow), y ECTV-MouKre, el único aislado de ECTV procedente de un ratón de campo encontrado hasta la fecha. Dentro de este clado, los aislados ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5, y ECTV-MouKre, que se han aislado de Alemania y Austria, se agrupan formando el subclado centroeuropeo. El clado asiático se compone por ERPV y los aislados de brotes en animalarios de EE.UU, ECTV-Naval y ECTV-Cornell.

Pases sucesivos de ECTV-Hampstead en CAMs han provocado la pérdida de varios genes a lo largo del genoma y una recombinación que ha llevado a la sustitución de parte de la región 5' con parte de la región 3' del genoma. La identificación de lecturas que tienen en común una secuencia de la región variable 3' pero difieren en la secuencia que se alinea con los extremos de la zona central única, apoya la hipótesis de la recombinación intragenómica (Figura R4). El resultado de este proceso es el aislado atenuado ECTV-Hampstead Egg (Fenner, 1949b) (Figura D1).

Existe poca información disponible acerca del origen de ECTV-Mill Hill. Se ha descrito como un derivado de ECTV-Hampstead o un virus relacionado, obtenido tras pases sucesivos en CAMs, como se hizo con ECTV-Hampstead Egg. Un análisis en detalle de las diferencias mostró que el aislado ECTV-Mill Hill presenta 331 nt diferentes con ECTV-Hampstead y 361 nt con ECTV-Moscow. Estos 30 nt de diferencia son los mismos que diferencian a ECTV-Hampstead de ECTV-Moscow indicando que ECTV-Mill Hill procede de un virus relacionado con ECTV-Hampstead y no con ECTV-Moscow (Figura D1). La comparación de los genomas de ECTV-Mill Hill y ECTV-Hampstead Egg muestra que estos virus comparten diferencias idénticas con respecto a ECTV-Hampstead (genes ortólogos a EVM031, EVM049, EVM127, EVM129, EVM138, EVM140, EVM144 y EVM150) que podrían ser resultado de la adaptación de estos virus a CAMs. Un argumento en contra de la procedencia de ECTV-Mill Hill desde ECTV-Hampstead es que ECTV-Mill Hill es el único ECTV que presenta intacto el gen que codifica una lectina de tipo C (EVMH10). Una explicación es que ECTV-Mill Hill sea el resultado del pase en CAM de un virus distinto de ECTV-Hampstead que presentaba originalmente el gen EVMH10 intacto y que quizás pudiera ser un virus más antiguo y próximo al origen de la especie (Figura D1). Sin embargo, tampoco podemos descartar la idea de que durante el pase en CAM se haya reestablecido la pauta de lectura del gen EVMH10, de forma análoga a lo ocurrido con el gen ortólogo a EVN038, que es una versión completa en ECTV-Hampstead Egg y ECTV-Mill Hill, y truncada en ECTV-Hampstead.

Se piensa que el intercambio de líneas celulares, medio de cultivo o anticuerpos contaminados con ECTV entre laboratorios de distintas partes del mundo, podría ser la causa de alguno de los brotes de ECTV en animalarios. ECTV-Moscow fue aislado de un brote en un animalario de Moscow en 1947 (Andrewes and Elford, 1947). La comparación de su genoma con el de ECTV-Hampstead indica que son virus muy similares con sólo 30 nt diferentes en nueve posiciones. Esto sugiere que ECTV-Moscow pudiera tener su origen en muestras de laboratorio contaminado con ECTV-Hampstead y procedente del Reino Unido (Figura D1). Pases en cultivos o en ratón podrían explicar la introducción de diferencias en

30 nt del genoma de ECTV-Moscow únicas con respecto al resto de aislados secuenciados. Como la secuencia de ECTV-Moscow se obtuvo utilizando la tecnología de Sanger, quisimos comprobar alguna de estas posiciones, encontrando que dos de las cuatro diferencias eran errores en la secuencia publicada de ECTV-Moscow (Chen et al., 2003). Por ello, nos hemos propuesto la re-secuenciación por Illumina del genoma de ECTV-Moscow que probablemente reducirá aún más el número de diferencias entre ECTV-Moscow y ECTV-Hampstead.

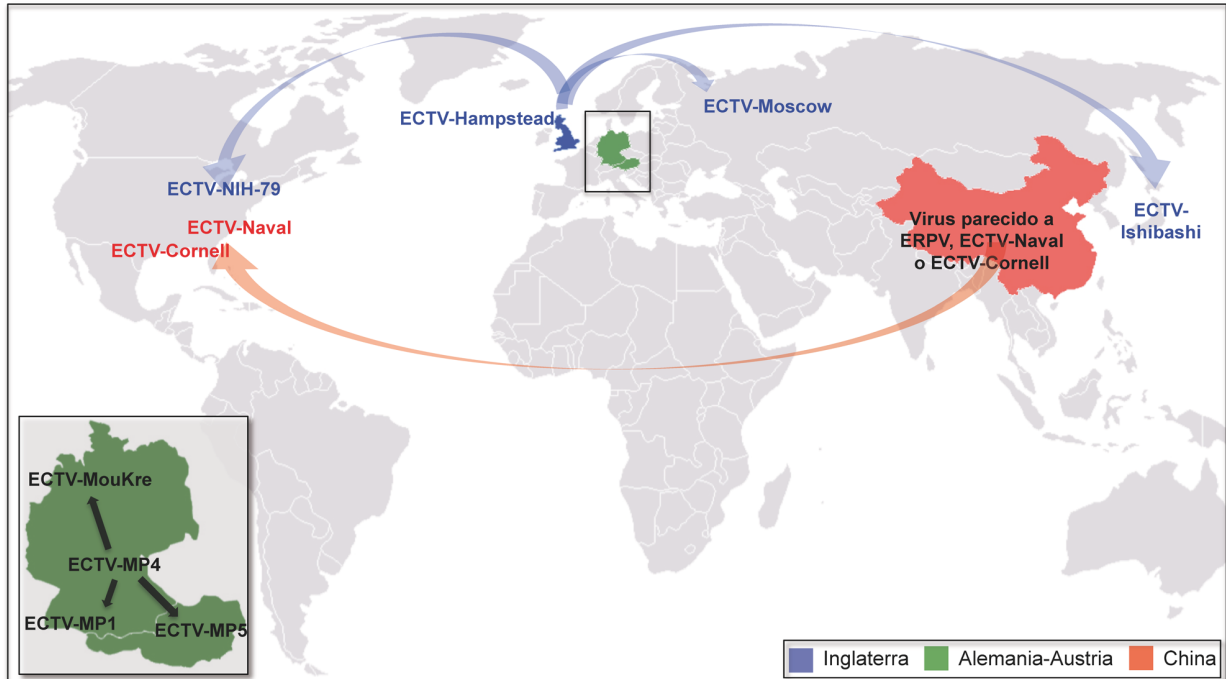
Es interesante observar que, a pesar de su origen geográfico, el aislado japonés ECTV-Ishibashi se agrupa con los virus de procedencia europea. Al igual que ECTV-Hampstead y ECTV-Mill Hill, el aislado ECTV-Ishibashi se diferencia de ECTV-Moscow en los mismos 30 nt sugiriendo que el brote ocurrido en Japón pudiera estar relacionado con un intercambio de material biológico contaminado con el aislado ECTV-Hampstead del Reino Unido (Figura D1).

El brote de ECTV-Cornell se originó por la inoculación de suero contaminado de China en ratones de laboratorio del Weill Medical College of Cornell University, Nueva York, EE.UU (Lipman et al., 2000). El brote de ECTV-Naval, ocurrido tres años antes en el Naval Medical Research Institute, Bethesda, EE.UU., también se atribuyó al uso de un suero comercial contaminado importado (Dick et al., 1996). El genoma de ECTV-Naval sólo se diferencia del de ECTV-Cornell en 4 nt y un análisis de las relaciones filogenéticas agrupó a ECTV-Naval y ECTV-Cornell con ERPV aislado en China. Por lo tanto, podemos concluir que el virus ECTV-Naval, al igual que ECTV-Cornell procede de China (Figura D1). Sin embargo, en uno de los brotes de los años 80, se había aislado el virus ECTV-NIH79 que curiosamente presentaba fenotipo V⁺ (Fenner, 1989). Esto sugiere que su origen podría estar de nuevo en ECTV-Hampstead, único ECTV secuenciado con fenotipo V⁺. Estos resultados dibujan un escenario en el que el intercambio de material de laboratorio (virus, células, etc..) con el Reino Unido previsiblemente provocó brotes durante la década de los 80s. La producción a gran escala de sueros de ratones en China y su importación a EE. UU. durante los años 90 provocó nuevos brotes con ECTV asiáticos (Figura D1).

El subclado centroeuropeo, constituido por los aislados ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5 y ECTV-MouKre, curiosamente también presentan menos cambios de nt con respecto a ECTV-Hampstead y por tanto está más próximo genéticamente a este aislado que a ECTV-Moscow. Sin embargo, no tenemos datos para afirmar que ECTV-Hampstead o ECTV-Mill Hill sean los antecesores del subclado centroeuropeo, como tampoco tenemos datos que respalden el camino opuesto. ECTV-MouKre está circulando en las poblaciones de ratones de campo y su genoma es muy parecido al resto de los aislados de este subclado procedentes de brotes independientes en la misma área geográfica. En animalarios con un nivel bajo de seguridad o aislamiento, ratones de campo infectados podrían haber entrado en contacto con los ratones de las colonias ocasionando los brotes del 1976 y del 1994 (Mahnel, 1983; Osterrieder et al., 1994). Además, teniendo en cuenta que ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5 no se han pasado extensamente en cultivos, es muy posible que sean muy parecidos, o casi idénticos, a los aislados circulantes en poblaciones naturales de ratones. Los aislados ECTV-MP1, ECTV-MP5 y ECTV-MouKre presentan un cambio común (P29H en ortólogo a EVM038) frente a ECTV-Hampstead y al aislado ECTV-MP4. Este cambio, compartido entre tres aislados obtenidos en diferentes países y años,

sugiere que ECTV-MP4 podría estar más relacionado con el ancestro centroeuropeo, como también indica el estudio filogenético.

A



B

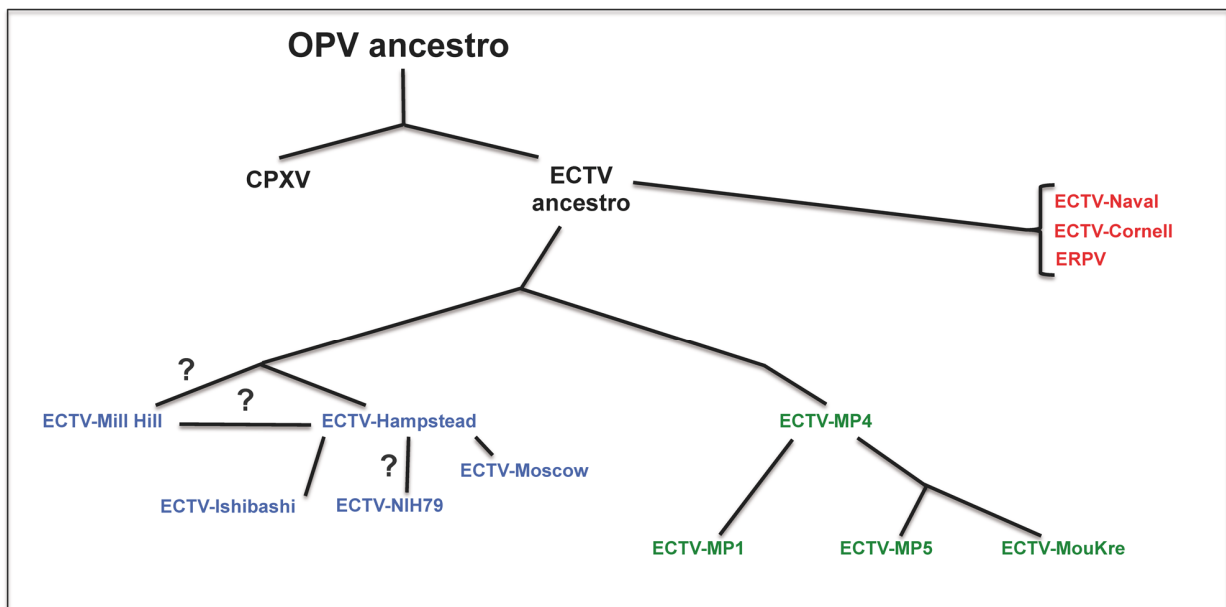


Figura D1. Esquema de la distribución geográfica y modelo evolutivo de los aislados de ECTV. (A) Reconstrucción del origen de los brotes de ECTV en los animalarios de todo el mundo debidos a la importación de material biológico. (B) Diagrama del proceso evolutivo de los aislados de ECTV. En rojo se indican los miembros del clado asiático, en azul y verde se muestran los aislados de clado europeo resaltando en color verde, los ECTV del subclado centroeuropeo.

7.6 El reservorio de ECTV en la naturaleza

CPXV se considera el ancestro de todos los OPV (Carroll et al., 2011). Este virus ha conservado en su genoma, genes que le permiten mantener una amplio rango de hospedador e infectar mamíferos

tan variados como roedores, gatos, perros y elefantes en zoológicos. Se conocen casos de zoonosis de CPXV en humanos desde que Edward Jenner, a finales del siglo XVIII, observara que las recolectoras de leche adquirían una enfermedad conocida como “la viruela de la vaca” que les protegía de la viruela. Sin embargo, en los últimos años se está registrando un aumento de brotes en humanos causados por el contacto con animales domésticos, sobre todo en países como Alemania, Noruega y Francia (Carroll et al., 2011; Herder et al., 2011; Kaysser et al., 2010; Ninove et al., 2009). Trabajos serológicos clásicos han demostrado que el reservorio de CPXV es muy variado incluyendo a especies de ratones salvajes como el topillo rojo (*Clethrionomys glareolus*), topillo nórdico (*Microtus oeconomus*), el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) y el ratón doméstico (*Mus musculus*) (Bennett et al., 1997; Chantrey et al., 1999; Crouch et al., 1995). Edward Jenner había atribuido la ausencia de CPXV en Irlanda a las diferentes prácticas ganaderas de este país frente a las de Inglaterra (Chantrey et al., 1999). Un estudio serológico de *Apodemus sylvaticus* irlandeses confirmó el ausencia de este virus en Irlanda (Chantrey et al., 1999). Recientemente, se ha aislado en Noruega CPXV-No-H2, un virus recombinante natural entre un ECTV y un CPXV. Esto indica que también en Noruega podría existir un reservorio natural de ECTV que al menos ocasionalmente infecta al mismo hospedador que CPXV (Okeke et al., 2012).

En el caso de ECTV, se desconoce su reservorio en la naturaleza. Sesenta años después de que el Dr. Frank Fenner examinara 150 ratones salvajes de la zona de Melbourne, Australia, sin encontrar evidencia de exposición a ECTV, el grupo del Dr. Andreas Nitsche aisló el virus ECTV-MouKre de un ratón de campo de la región de Krefeld, Alemania (Fenner, 1949a; Andreas Nitsche, comunicación personal). El aislamiento de ECTV-MouKre fue casual, ya que el grupo del Dr. Andreas Nitsche estaba buscando CPXV en ratones de campo en Alemania. Los ratones de la región de Krefeld constituyen el primer reservorio de ECTV encontrado en la naturaleza. También se ha descrito un caso de infección ocasional de un zorro en la naturaleza con ECTV, aunque no se considera que este animal sea su reservorio natural (Hemann Meyer, comunicación personal).

ECTV infecta ratones de laboratorio (*M. musculus*) que pueden ser susceptibles (BALB/c) o resistentes (B6) a la infección (Esteban and Buller, 2005). El modelo de infección en ratones altamente susceptibles como los BALB/c consiste en la infección por vía FP y nos permite realizar estudios de identificación de genes implicados en las interacciones virus-hospedador (Esteban and Buller, 2005). Sin embargo, este modelo, por ser demasiado susceptible a la infección, no parece reproducir el comportamiento esperado de un virus en su hospedador natural. Parece razonable pensar que durante la larga co-evolución virus-hospedador, este último haya adquirido un cierto grado de resistencia al virus que permita la existencia de ambos en la naturaleza. Este balance normalmente se pierde cuando el virus salta a un nuevo hospedador, como en este caso las cepas BALB/c de ratón, causando una enfermedad extremadamente virulenta, muy útil en el laboratorio pero diferente a la realidad. Estas cepas clásicas de ratones de laboratorio son el resultado de un proceso de intercambio genético entre dos poblaciones de ratones salvajes, *M. musculus domesticus* y *M. musculus musculus*, procedentes de Europa y de Rusia-Asia (Norte de China y Japón), respectivamente (Bonhomme, 1986). Se cree que estas cepas entraron en contacto en Europa central hace unos 5.000 años (Bonhomme, 1986). En un análisis de la virulencia de ECTV en especies salvajes modernas de ratones genéticamente cercanos a la del ratones de laboratorio se determinó que las especies *Pyromys platythrix* y *Coelmys pahari* eran

completamente resistentes a la infección con ECTV-NIH79, ya que apenas se detectaba replicación del virus en los órganos; mientras que *Mus caroli*, *Mus cookii* y *Mus cervicolor popaeus* presentaban una alta susceptibilidad caracterizada por una infección sistémica severa y en algunos casos por lesiones e inflamación de la pata (Buller et al., 1986). El mismo estudio realizado con *M. musculus domesticus* y *M. musculus musculus* confirmó que estas especies de ratón como candidatos a reservorio de ECTV en la naturaleza, al ser moderadamente resistentes a una infección con el aislado ECTV-NIH79 (Buller et al., 1986). Por desgracia no se ha podido determinar el tipo de ratón desde el que se aisló ECTV-MouKre. Sin embargo, el hecho de que *Mus musculus musculus* y *Mus musculus domesticus* sean de los ratones más numerosos en Europa central, donde se aisló ECTV-MouKre y su resistencia moderada a la infección por ECTV, sugieren que estas cepas de ratón podrían ser el reservorio natural de ECTV en esta zona.

Hasta la fecha, no hay evidencia de un reservorio natural para el clado asiático formado por ECTV-Naval, ECTV-Cornell y ERPV. El genoma de estos virus es muy distinto al de los miembros del clado europeo, probablemente por una adaptación a un hospedador genéticamente distinto. Este podría ser *M. musculus musculus*, por ser la cepa mayoritaria en el continente asiático (Bonhomme, 1986). En los trabajos publicados sobre ERPV, el ECTV relacionado con eritromelalgia, se hace referencia a la existencia de unos ECTV chinos (CECT, strain MB35) aislados de ratones en los años 60 (Zheng et al., 1992). Pese a que desafortunadamente no es posible encontrar más información sobre estos aislados, su descripción sugiere la existencia de un reservorio para ECTV en China. A este respecto, es interesante discutir el origen de ERPV. Este virus se aisló en humano desde muestras de garganta de individuos afectados de eritromelalgia, una enfermedad vascular que afecta las extremidades y se caracteriza por rubicundez, hipertermia y vasodilatación (Cohen, 2000). Se han descrito al menos seis aislados de ERPV procedentes de individuos enfermos en distintos sitios de China en 1987 (H-1 en el condado de Hanchuan, P-1, P-2, P-3 y P-4 en el condado de Puqi y W-1 en Wuhan City) (Zheng et al., 1992; Zheng et al., 1988). Todos se han pasado en cultivos celulares y el aislado H-1 se ha pasado además en ratón (Zheng et al., 1992; Zheng et al., 1988). ECTV tiene un rango de hospedador restringido a ratones, por lo que resulta extraño que cause una zoonosis en humanos y que además curse con una enfermedad tan diferente a otras zoonosis causadas por OPVs (Baxby, 1977; Giulio and Eckburg, 2004). Así, la zoonosis de CPXV se caracteriza por grandes pústulas ulcerosas y necróticas que afectan generalmente sólo al sitio de contacto con el virus (Durauffour et al., 2013; Favier et al., 2011) y *monkeypox*, causada por MPXV, es una enfermedad que recuerda a la viruela, por la aparición de pústulas extendidas en todo el cuerpo y en África presenta una tasa de mortalidad entre 4-22 % (Hutin et al., 2001; Meyer et al., 2002). Sin embargo hay que recordar que un brote en EE.UU. en el año 2003, originado por la importación de ratas de Gambia infectadas, fue causado por una estirpe menos virulenta de las que circulan en África, ya que no provocó muertes a pesar de inducir los mismos síntomas descritos en los brotes en África (Reed et al., 2004). Por estos motivos, no se debería descartar la posibilidad de que ERPV sea una contaminación durante el crecimiento en cultivos celulares con un ECTV, como nos sugirió anteriormente el análisis del genoma de VACV-WAU86 y VACV-WAU88-1.

8 Conclusiones

1. Se ha secuenciado el genoma de nueve nuevos ECTVs mediante pirosecuenciación con una cobertura entre 32x y 404x. El método de pirosecuenciación genera un elevado número de errores en la determinación de homopolímeros, y hemos demostrado en estudios comparativos que la secuenciación por Illumina es un método más idóneo para este tipo de estudios.
2. Los genomas de todos los aislados de ECTV comparten un 98% de identidad. La región central que codifica para proteínas estructurales, de replicación y transcripción se encuentra conservada entre los distintos aislados, acumulándose las diferencias en los extremos del genoma donde se encuentran codificados los genes implicados en inmunomodulación.
3. El análisis filogenético de los aislados de ECTV revela la existencia de dos clados: uno asiático y uno europeo. El clado asiático está formado por los aislados ECTV-Naval y ECTV-Cornell, que causaron brotes en EE.UU., y por ERPV. El clado europeo comprende ECTV-Hampstead, ECTV-Moscow, ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5, ECTV-MouKre y el aislado japonés ECTV-Ishibashi. Los aislados de ECTV de brotes de colonias del área centroeuropea, compuestos por ECTV-MP1, ECTV-MP4, ECTV-MP5, ECTV-MouKre, se agrupan formando un subclado bien definido. Un miembro de este subclado, ECTV-MouKre, está circulando actualmente en ratones de campo de Alemania y representa la primera descripción de un reservorio natural para ECTV.
4. Debido a que los genomas de ECTV-Naval y ECTV-Cornell son prácticamente idénticos, proponemos que el brote de ECTV-Naval podría tener el mismo origen que el suero de ratones chinos que ocasionó el brote de ECTV-Cornell unos años después.
5. Los pases sucesivos de ECTV *in vitro* introducen cambios en el genoma del virus que determinan la pérdida de genes implicados en la modulación de la respuesta inmune, e incluso una reordenación genómica de los extremos, como en el genoma de ECTV-Hampstead Egg.
6. El aislado ECTV-Mill Hill ha perdido dos genes que codifican para proteínas de tipo anquirina y uno que codifica para la vCKBP 35K, mientras que ECTV-Ishibashi ha perdido solo un gen que codifica para una proteína de tipo anquirina. La fuerte atenuación de estos aislados *in vivo* señala a estos genes como importantes determinantes de virulencia.
7. A diferencia de los virus altamente virulentos ECTV-Moscow, ECTV-Naval y ECTV-Cornell, los aislados del subclado centroeuropeo muestran un grado intermedio de virulencia en ratones BALB/c infectados por la ruta FP.
8. Hemos identificado dos genes como posibles responsables del bloqueo en la respuesta inmune que ocurre en los ratones infectados con ECTV-Moukre pero no con el resto de virus del subclado centroeuropeo.
9. ECTV-Hampstead es el único aislado en el que los viriones se incluyen en los ATIs, tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a presencia de un gen intacto que codifica la proteína P4c. Esta particularidad podría comprometer su capacidad de diseminación, su virulencia dependiente de dosis y su eficacia en la transmisión entre hospedadores.
10. Los aislados WAU86 y WAU88-1, inicialmente descritos como ECTV, son aislados de VACV muy cercanos a la estirpe VACV Lister. Estos virus presentan un alto grado de atenuación en ratones BALB/c infectados por la ruta IN.

9 Bibliografía

Abdallrhman, I., Gurt, I., Katz, E., 2006. Protection induced in mice against a lethal orthopox virus by the Lister strain of vaccinia virus and modified vaccinia virus Ankara (MVA). *Vaccine* 24, 4152-4160.

Afonso, P.P., Silva, P.M., Schnellrath, L.C., Jesus, D.M., Hu, J., Yang, Y., Renne, R., Attias, M., Condit, R.C., Moussatche, N., Damaso, C.R., 2012. Biological characterization and next-generation genome sequencing of the unclassified Cotia virus SPAn232 (Poxviridae). *Journal of Virology* 86, JVI.07162-07111-.

Ahn, B.Y., Moss, B., 1992. RNA polymerase-associated transcription specificity factor encoded by vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 3536-3540.

Ahn, B.Y., Rosel, J., Cole, N.B., Moss, B., 1992. Identification and expression of rpo19, a vaccinia virus gene encoding a 19-kilodalton DNA-dependent RNA polymerase subunit. *Journal of Virology* 66, 971-982.

Alcami, A., 2003. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nature reviews. Immunology* 3, 36-50.

Alcami, A., Koszinowski, U.H., 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Trends in microbiology* 8, 410-418.

Alcami, A., Smith, G.L., 1992. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71, 153-167.

Alcamí, A., Smith, G.L., 1992. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell* 71, 153-167.

Alcamí, A., Smith, G.L., 1995. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *Journal of virology* 69, 4633-4639.

Alcamí, A., Smith, G.L., 1996. Receptors for gamma-interferon encoded by poxviruses: implications for the unknown origin of vaccinia virus. *Trends in microbiology* 4, 321-326.

Alcamí, a., Symons, J.a., Collins, P.D., Williams, T.J., Smith, G.L., 1998. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160, 624-633.

Alejo, A., Pontejo, S.M., Alcamí, A., 2011. Advances in TNF Family Research. 691, 203-210.

Alejo, A., Ruiz-Argüello, M.B., Ho, Y., Smith, V.P., Saraiva, M., Alcamí, A., 2006. A chemokine-binding domain in the tumor necrosis factor receptor from variola (smallpox) virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5995-6000.

Alejo, A., Saraiva, M., Ruiz-Arguello, M.B., Viejo-Borbolla, A., de Marco, M.F., Salguero, F.J., Alcamí, A., 2009. A method for the generation of ectromelia virus (ECTV) recombinants: in vivo analysis of ECTV vCD30 deletion mutants. *PLoS ONE* 4, e5175.

Allen, A.M., Clarke, G.L., Ganaway, J.R., Lock, A., Werner, R.M., 1981. Pathology and diagnosis of mousepox. *Laboratory animal science* 31, 599-608.

Almazan, F., Tschärke, D.C., Smith, G.L., 2001. The vaccinia virus superoxide dismutase-like protein (A45R) is a virion component that is nonessential for virus replication. *Journal of Virology* 75, 7018-7029.

- Alzhanova, D., Edwards, D.M., Hammarlund, E., Scholz, I.G., Horst, D., Wagner, M.J., Upton, C., Wiertz, E.J., Slifka, M.K., Fröh, K., 2009. Cowpox virus inhibits the transporter associated with antigen processing to evade T cell recognition. *Cell host & microbe* 6, 433-445.
- Amegadzie, B.Y., Ahn, B.Y., Moss, B., 1991a. Identification, sequence, and expression of the gene encoding a Mr 35,000 subunit of the vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 13712-13718.
- Amegadzie, B.Y., Ahn, B.Y., Moss, B., 1992a. Characterization of a 7-kilodalton subunit of vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase with structural similarities to the smallest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Journal of virology* 66, 3003-3010.
- Amegadzie, B.Y., Holmes, M.H., Cole, N.B., Jones, E.V., Earl, P.L., Moss, B., 1991b. Identification, sequence, and expression of the gene encoding the second-largest subunit of the vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 180, 88-98.
- Amegadzie, B.Y., Sisler, J.R., Moss, B., 1992b. Frame-shift mutations within the vaccinia virus A-type inclusion protein gene. *Virology* 186, 777-782.
- Andrewes, C.H., Elford, W.J., 1947. Infections ectromelia; experiments on interference and immunization. *British journal of experimental pathology* 28, 278-285.
- Ansarah-Sobrinho, C., Moss, B., 2004a. Role of the I7 protein in proteolytic processing of vaccinia virus membrane and core components. *Journal of Virology* 78, 6335-6343.
- Ansarah-Sobrinho, C., Moss, B., 2004b. Vaccinia virus G1 protein, a predicted metalloprotease, is essential for morphogenesis of infectious virions but not for cleavage of major core proteins. *Journal of Virology* 78, 6855-6863.
- Antoine, G., Scheifflinger, F., Dorner, F., Falkner, F.G., 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244, 365-396.
- Aoyagi, M., Zhai, D., Jin, C., Aleshin, A.E., Stec, B., Reed, J.C., Liddington, R.C., 2007. Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein science : a publication of the Protein Society* 16, 118-124.
- Arita, I., Gispén, R., Kalter, S.S., Wah, L.T., Marennikova, S.S., Netter, R., Tagaya, I., 1972. Outbreaks of monkeypox and serological surveys in nonhuman primates. *Bulletin of the World Health Organization* 46, 625-631.
- Babkin, I.V., Babkina, I.N., 2012. A retrospective study of the orthopoxvirus molecular evolution. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12, 1597-1604.
- Babkin, I.V., Shchelkunov, S.N., 2006. Time scale of Poxvirus evolution. *Molecular Biology* 40, 16-19.
- Baggiolini, M., 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.
- Bahar, M.W., Kenyon, J.C., Putz, M.M., Abrescia, N.G.A., Pease, J.E., Wise, E.L., Stuart, D.I., Smith, G.L., Grimes, J.M., 2008. Structure and function of A41, a vaccinia virus chemokine binding protein. *PLoS pathogens* 4, e5.

- Banville, M., Dumas, F., Trifiro, S., Arif, B., Richardson, C., 1992. The predicted amino acid sequence of the spheroidin protein from Amsacta moorei entomopoxvirus: lack of homology between major occlusion body proteins of different poxviruses. *The Journal of general virology* 73 (Pt 3), 559-566.
- Baroudy, B.M., Venkatesan, S., Moss, B., 1982. Incompletely base-paired flip-flop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* 28, 315-324.
- Barry, M., van Buuren, N., Burles, K., Mottet, K., Wang, Q., Teale, A., 2010. Poxvirus exploitation of the ubiquitin-proteasome system. *Viruses* 2, 2356-2380.
- Barry, S.M., Johnson, M.A., Janossy, G., 2000. Cytopathology or immunopathology? The puzzle of cytomegalovirus pneumonitis revisited. *Bone Marrow Transplant* 26, 591-597.
- Baxby, D., 1977. Is cowpox misnamed? A review of 10 human cases. *British medical journal* 1, 1379-1381.
- Baxby, D., Ghaboosi, B., 1977. Laboratory characteristics of poxviruses isolated from captive elephants in Germany. *The Journal of general virology* 37, 407-414.
- Bayliss, C.D., Smith, G.L., 1996. Vaccinia Virion Protein I8R Has both DNA and RNA Helicase Activities : Implications for Vaccinia Virus Transcription. 70, 794-800.
- Bayliss, C.D., Smith, G.L., 1997. Vaccinia virion protein VP8, the 25 kDa product of the L4R gene, binds single-stranded DNA and RNA with similar affinity. *Nucleic Acids Research* 25, 3984-3990.
- Beattie, E., Paoletti, E., Tartaglia, J., 1995. Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L- and E3L- mutant viruses. *Virology* 210, 254-263.
- Beattie, E., Tartaglia, J., Paoletti, E., 1991. Vaccinia virus-encoded eIF-2 alpha homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology* 183, 419-422.
- Begon, M., Hazel, S.M., Baxby, D., Bown, K., Cavanagh, R., Chantrey, J., Jones, T., Bennett, M., 1999. Transmission dynamics of a zoonotic pathogen within and between wildlife host species. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 266, 1939-1945.
- Bell, P.J., 2001. Viral eukaryogenesis: was the ancestor of the nucleus a complex DNA virus? *Journal of molecular evolution* 53, 251-256.
- Bennett, M., Crouch, A.J., Begon, M., Duffy, B., Feore, S., Gaskell, R.M., Kelly, D.F., McCracken, C.M., Vicary, L., Baxby, D., 1997. Cowpox in British voles and mice. *Journal of comparative pathology* 116, 35-44.
- Betakova, T., Wolffe, E.J., Moss, B., 1999. Regulation of vaccinia virus morphogenesis: phosphorylation of the A14L and A17L membrane proteins and C-terminal truncation of the A17L protein are dependent on the F10L kinase. *Journal of Virology* 73, 3534-3543.
- Betakova, T., Wolffe, E.J., Moss, B., 2000. The vaccinia virus A14.5L gene encodes a hydrophobic 53-amino-acid virion membrane protein that enhances virulence in mice and is conserved among vertebrate poxviruses. *Journal of Virology* 74, 4085-4092.

- Bisht, H., Weisberg, A.S., Moss, B., 2008. Vaccinia virus I1 protein is required for cell entry and membrane fusion. *Journal of Virology* 82, 8687-8694.
- Black, E.P., Condit, R.C., 1996. Phenotypic characterization of mutants in vaccinia virus gene G2R, a putative transcription elongation factor. *Journal of Virology* 70, 47-54.
- Blanié, S., Mortier, J., Delverdier, M., Bertagnoli, S., Camus-Bouclainville, C., 2009. M148R and M149R are two virulence factors for myxoma virus pathogenesis in the European rabbit. *Veterinary Research* 40, 14.
- Blasco, R., Moss, B., 1991. Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *Journal of virology* 65, 5910-5920.
- Blasco, R., Moss, B., 1992. Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread. *Journal of virology* 66, 4170-4179.
- Bonhomme, F., 1986. Evolutionary relationships in the genus Mus. *Current topics in microbiology and immunology* 127, 19-34.
- Born, T.L., Morrison, L.A., Esteban, D.J., VandenBos, T., Thebeau, L.G., Chen, N., Spriggs, M.K., Sims, J.E., Buller, R.M., 2000. A poxvirus protein that binds to and inactivates IL-18, and inhibits NK cell response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164, 3246-3254.
- Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J.A., Smith, G.L., Dower, S.K., O'Neill, L.A., 2000. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10162-10167.
- Brandt, T., Heck, M.C., Vijaysri, S., Jentarra, G.M., Cameron, J.M., Jacobs, B.L., 2005. The N-terminal domain of the vaccinia virus E3L-protein is required for neurovirulence, but not induction of a protective immune response. *Virology* 333, 263-270.
- Brandt, T.A., Jacobs, B.L., 2001. Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *Journal of Virology* 75, 850-856.
- Bratke, K.a., McLysaght, A., 2008. Identification of multiple independent horizontal gene transfers into poxviruses using a comparative genomics approach. *BMC evolutionary biology* 8, 67.
- Bratke, K.a., McLysaght, A., Rothenburg, S., 2013. A survey of host range genes in poxvirus genomes. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 14, 406-425.
- Brick, D.J., Burke, R.D., Minkley, A.A., Upton, C., 2000. Ectromelia virus virulence factor p28 acts upstream of caspase-3 in response to UV light-induced apoptosis. *The Journal of general virology* 81, 1087-1097.
- Brown, E., Senkevich, T.G., Moss, B., 2006. Vaccinia virus F9 virion membrane protein is required for entry but not virus assembly, in contrast to the related L1 protein. *Journal of Virology* 80, 9455-9464.

Brownstein, D., Bhatt, P.N., Jacoby, R.O., 1989. Mousepox in inbred mice innately resistant or susceptible to lethal infection with ectromelia virus. V. Genetics of resistance to the Moscow strain. *Archives of virology* 107, 35-41.

Brownstein, D.G., Bhatt, P.N., Gras, L., Budris, T., 1992. Serial backcross analysis of genetic resistance to mousepox, using marker loci for Rmp-2 and Rmp-3. *Journal of Virology* 66, 7073-7079.

Brownstein, D.G., Gras, L., 1995. Chromosome mapping of Rmp-4, a gonad-dependent gene encoding host resistance to mousepox. *Journal of Virology* 69, 6958-6964.

Brownstein, D.G., Gras, L., 1997. Differential pathogenesis of lethal mousepox in congenic DBA/2 mice implicates natural killer cell receptor NKR-P1 in necrotizing hepatitis and the fifth component of complement in recruitment of circulating leukocytes to spleen. *Am J Pathol* 150, 1407-1420.

Broyles, S.S., Fesler, B.S., 1990. Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor. *Journal of Virology* 64, 1523-1529.

Broyles, S.S., Moss, B., 1986. Homology between RNA polymerases of poxviruses, prokaryotes, and eukaryotes: nucleotide sequence and transcriptional analysis of vaccinia virus genes encoding 147-kDa and 22-kDa subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 3141-3145.

Buller, R., 2004. Mousepox: a small animal model for biodefense research. *Applied Biosafety* 9, 10-19.

Buller, R.M., Chakrabarti, S., Cooper, J.a., Twardzik, D.R., Moss, B., 1988a. Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence. *Journal of virology* 62, 866-874.

Buller, R.M., Chakrabarti, S., Moss, B., Fredrickson, T., 1988b. Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology* 164, 182-192.

Buller, R.M., Palumbo, G.J., 1991. Poxvirus pathogenesis. *Microbiological reviews* 55, 80-122.

Buller, R.M., Potter, M., Wallace, G.D., 1986. Variable resistance to ectromelia (mousepox) virus among genera of *Mus*. *Current topics in microbiology and immunology* 127, 319-322.

Burshtyn, D.N., 2013. NK cells and poxvirus infection. *Frontiers in immunology* 4, 7.

Byun, M., Wang, X., Pak, M., Hansen, T.H., Yokoyama, W.M., 2007. Cowpox virus exploits the endoplasmic reticulum retention pathway to inhibit MHC class I transport to the cell surface. *Cell host & microbe* 2, 306-315.

Cameron, C.M., Barrett, J.W., Mann, M., Lucas, a., McFadden, G., 2005. Myxoma virus M128L is expressed as a cell surface CD47-like virulence factor that contributes to the downregulation of macrophage activation in vivo. *Virology* 337, 55-67.

Campbell, J.A., Trossman, D.S., Yokoyama, W.M., Carayannopoulos, L.N., 2007. Zoonotic orthopoxviruses encode a high-affinity antagonist of NKG2D. *The Journal of experimental medicine* 204, 1311-1317.

Cao, J., Koop, B.F., 1997. A human homolog of the vaccinia virus HindIII K4L gene is a member of the phospholipase D superfamily. 48, 11-18.

Carfi, A., Smith, C.A., Smolak, P.J., McGrew, J., Wiley, D.C., 1999. Structure of a soluble secreted chemokine inhibitor vCCI (p35) from cowpox virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12379-12383.

Carroll, D.S., Emerson, G.L., Li, Y., Sammons, S., Olson, V., Frace, M., Nakazawa, Y., Czerny, C.P., Tryland, M., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Olsen-Rasmussen, M., Khristova, M., Govil, D., Karem, K., Damon, I.K., Meyer, H., 2011. Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification. *PloS one* 6, e23086.

Carter, G.C., Law, M., Hollinshead, M., Smith, G.L., 2005. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *The Journal of general virology* 86, 1279-1290.

Cassetti, M.C., Merchlinsky, M., Wolffe, E.J., Weisberg, A.S., Moss, B., 1998. DNA packaging mutant: repression of the vaccinia virus A32 gene results in noninfectious, DNA-deficient, spherical, enveloped particles. *Journal of Virology* 72, 5769-5780.

Chantrey, J., Meyer, H., Baxby, D., Begon, M., Bown, K.J., Hazel, S.M., Jones, T., Montgomery, W.I., Bennett, M., 1999. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiology and infection* 122, 455-460.

Chaudhri, G., Panchanathan, V., Bluethmann, H., Karupiah, G., 2006. Obligatory requirement for antibody in recovery from a primary poxvirus infection. *Journal of Virology* 80, 6339-6344.

Chaudhri, G., Panchanathan, V., Buller, R.M.L., van den Eertwegh, A.J.M., Claassen, E., Zhou, J., de Chazal, R., Laman, J.D., Karupiah, G., 2004. Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9057-9062.

Chen, N., Danila, M.I., Feng, Z., Buller, R.M.L., Wang, C., Han, X., Lefkowitz, E.J., Upton, C., 2003. The genomic sequence of ectromelia virus, the causative agent of mousepox. *Virology* 317, 165-186.

Chen, N., Li, G., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., Jahrling, P.B., Feng, Z., Schriewer, J., Buck, C., Wang, C., Lefkowitz, E.J., Esposito, J.J., Harms, T., Damon, I.K., Roper, R.L., Upton, C., Buller, R.M.L., 2005. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology* 340, 46-63.

Chiu, W.-L., Lin, C.-L., Yang, M.-H., Tzou, D.-L.M., Chang, W., 2007. Vaccinia virus 4c (A26L) protein on intracellular mature virus binds to the extracellular cellular matrix laminin. *Journal of virology* 81, 2149-2157.

Chiu, W.L., Chang, W., 2002. Vaccinia virus J1R protein: a viral membrane protein that is essential for virion morphogenesis. *Journal of Virology* 76, 9575-9587.

Christen, L.M., Sanders, M., Wiler, C., Niles, E.G., 1998. Vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase I is an essential viral early gene transcription termination factor. *Virology* 245, 360-371.

Chung, C.S., Hsiao, J.C., Chang, Y.S., Chang, W., 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *Journal of virology* 72, 1577-1585.

Cliquet, F., Barrat, J., Guiot, A.L., Caël, N., Boutrand, S., Maki, J., Schumacher, C.L., 2008. Efficacy and bait acceptance of vaccinia vectored rabies glycoprotein vaccine in captive foxes (*Vulpes vulpes*), raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and dogs (*Canis familiaris*). *Vaccine* 26, 4627-4638.

- Cohen, J.S., 2000. Erythromelalgia: new theories and new therapies. *J Am Acad Dermatol* 43, 841-847.
- Colamonici, O.R., Domanski, P., Sweitzer, S.M., Lerner, A., Buller, R.M., 1995. Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 15974-15978.
- Constantin, C.M., Martinelli, A.M., Bonney, E.A., Strickland, O.L., 2003. Smallpox: an update for nurses. *Biol Res Nurs* 4, 282-294.
- Crouch, A.C., Baxbyl, D., Mccracken, C.M., Gaskell, R.M., Bennett, M., 1995. Serological evidence for the reservoir hosts of cowpox virus in British wildlife Immunofluorescence Sera from most voles , mice and rats were tested in immunofluorescence (IF) Haemagglutination-inhibition. 185-191.
- Cudmore, S., Blasco, R., Vincentelli, R., Esteban, M., Sodeik, B., Griffiths, G., Krijnse Locker, J., 1996. A vaccinia virus core protein, p39, is membrane associated. *Journal of Virology* 70, 6909-6921.
- Culyba, M.J., Harrison, J.E., Hwang, Y., Bushman, F.D., 2006. DNA cleavage by the A22R resolvase of vaccinia virus. *Virology* 352, 466-476.
- Cyrklaff, M., Risco, C., Fernández, J.J., Jiménez, M.V., Estéban, M., Baumeister, W., Carrascosa, J.L., 2005. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2772-2777.
- da Fonseca, F.G., Trindade, G.S., Silva, R.L.A., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G., 2002. Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *The Journal of general virology* 83, 223-228.
- da Fonseca, F.G., Weisberg, A.S., Caeiro, M.F., Moss, B., 2004. Vaccinia virus mutants with alanine substitutions in the conserved G5R gene fail to initiate morphogenesis at the nonpermissive temperature. *Journal of Virology* 78, 10238-10248.
- da Fonseca, F.G., Wolffe, E.J., Weisberg, A., Moss, B., 2000. Characterization of the vaccinia virus H3L envelope protein: topology and posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail. *Journal of Virology* 74, 7508-7517.
- Damon, I., Murphy, P.M., Moss, B., 1998. Broad spectrum chemokine antagonistic activity of a human poxvirus chemokine homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6403-6407.
- Davies, F.G., Mungai, J.N., Shaw, T., 1975. Characteristics of a Kenyan camelpox virus. *The Journal of hygiene* 75, 381-385.
- Delano, M.L., Brownstein, D.G., 1995. Innate resistance to lethal mousepox is genetically linked to the NK gene complex on chromosome 6 and correlates with early restriction of virus replication by cells with an NK phenotype. *Journal of Virology* 69, 5875-5877.
- Derrien, M., Punjabi, A., Khanna, M., Grubisha, O., Traktman, P., 1999. Tyrosine phosphorylation of A17 during vaccinia virus infection: involvement of the H1 phosphatase and the F10 kinase. *Journal of Virology* 73, 7287-7296.

- Dick, E.J., Kittell, C.L., Meyer, H., Farrar, P.L., Ropp, S.L., Esposito, J.J., Buller, R.M., Neubauer, H., Kang, Y.H., McKee, A.E., 1996. Mousepox outbreak in a laboratory mouse colony. *Laboratory animal science* 46, 602-611.
- Dobbelstein, M., Shenk, T., 1996. Protection against apoptosis by the vaccinia virus SPI-2 (B13R) gene product. *Journal of virology* 70, 6479-6485.
- Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L., Smith, G.L., 2010. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science (New York, N.Y.)* 327, 873-876.
- Doglio, L., De Marco, A., Schleich, S., Roos, N., Krijnse Locker, J., 2002. The Vaccinia virus E8R gene product: a viral membrane protein that is made early in infection and packaged into the virions' core. *Journal of Virology* 76, 9773-9786.
- Downie, A.W., 1951. Jenner's cowpox inoculation. *British medical journal* 2, 251-256.
- Dumbell, K., Richardson, M., 1993. Virological investigations of specimens from buffaloes affected by buffalopox in Maharashtra State, India between 1985 and 1987. *Archives of virology* 128, 257-267.
- Duncan, S.A., Smith, G.L., 1992. Identification and characterization of an extracellular envelope glycoprotein affecting vaccinia virus egress. *Journal of Virology* 66, 1610-1621.
- Durauffour, S., Mertens, B., Meyer, H., van den Oord, J.J., Mitera, T., Matthys, P., Snoeck, R., Andrei, G., 2013. Emergence of cowpox: study of the virulence of clinical strains and evaluation of antivirals. *PloS one* 8, e55808.
- Dyster, L.M., Niles, E.G., 1991. Genetic and biochemical characterization of vaccinia virus genes D2L and D3R which encode virion structural proteins. *Virology* 182, 455-467.
- Eckert, D., Williams, O., Meseda, C.A., Merchlinsky, M., 2005. Nicking-Joining Enzyme Is Encoded by Vaccinia Virus. 79, 15084-15090.
- Esposito, J.J., Sammons, S.a., Frace, a.M., Osborne, J.D., Olsen-Rasmussen, M., Zhang, M., Govil, D., Damon, I.K., Kline, R., Laker, M., Li, Y., Smith, G.L., Meyer, H., Leduc, J.W., Wohlhueter, R.M., 2006. Genome sequence diversity and clues to the evolution of variola (smallpox) virus. *Science (New York, N.Y.)* 313, 807-812.
- Esteban, D.J., Buller, R.M.L., 2005. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. *The Journal of general virology* 86, 2645-2659.
- Esteban, M., 2009. Attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC as promising vaccine candidates against HIV/AIDS. *Human vaccines* 5, 867-871.
- Evans, E., Klemperer, N., Ghosh, R., Traktman, P., 1995. The vaccinia virus D5 protein, which is required for DNA replication, is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase. *Journal of Virology* 69, 5353-5361.
- Fallon, P.G., Alcami, A., 2006. Pathogen-derived immunomodulatory molecules: future immunotherapeutics? *Trends in immunology* 27, 470-476.

Fang, M., Sigal, L.J., 2005. Antibodies and CD8+ T cells are complementary and essential for natural resistance to a highly lethal cytopathic virus. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 175, 6829-6836.

Faundez, I.S.d., Niemialtowski, M., 1990. Electron microscopy, plaque assay and preliminary serological characterization of three ectromelia virus strains isolated in Poland in the period 1986-1988. *Archives of Virology*, 285-291.

Favier, A.-L., Flusin, O., Lepreux, S., Fleury, H., Labrèze, C., Georges, A., Crance, J.-M., Boralevi, F., 2011. Necrotic ulcerated lesion in a young boy caused by cowpox virus infection. *Case reports in dermatology* 3, 186-194.

Fenner, F., 1947. Studies in infectious ectromelia in mice; natural transmission; the portal of entry of the virus. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 25, 275-282.

Fenner, F., 1948. The pathogenesis of the acute exanthems; an interpretation based on experimental investigations with mousepox; infectious ectromelia of mice. *Lancet* 2, 915-920.

Fenner, F., 1949a. Mouse-pox; infectious ectromelia of mice; a review. *J Immunol* 63, 341-373.

Fenner, F., 1949b. Studies in mousepox, infectious ectromelia of mice; a comparison of the virulence and infectivity of three strains of ectromelia virus. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 27, 31-43.

Fenner, F., 1981. Mousepox (infectious ectromelia): past, present, and future. *Laboratory animal science* 31, 553-559.

Fenner, F., Wittek, R. & Dumbell, K. R. (1989). The global spread, control and eradication of smallpox. In *The Orthopoxviruses*, pp. 317–352. San Diego, CA: Academic Press.

Fenner, F., 1993. Smallpox: emergence, global spread, and eradication. *Hist Philos Life Sci* 15, 397-420.

Forterre, P., 2006. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus research* 117, 5-16.

Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., Olsen, G.J., 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 74, 2461-2470.

Froggatt, G.C., Smith, G.L., Beard, P.M., 2007. Vaccinia virus gene F3L encodes an intracellular protein that affects the innate immune response. *The Journal of general virology* 88, 1917-1921.

Funahashi, S., Sato, T., Shida, H., 1988. Cloning and characterization of the gene encoding the major protein of the A-type inclusion body of cowpox virus. *The Journal of general virology* 69 (Pt 1), 35-47.

Garcel, A., Crance, J.-M., Drillien, R., Garin, D., Favier, A.-L., 2000. Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *The Journal of general virology* 81, 1906-1916.

Garcel, A., Crance, J.M., Drillien, R., Garin, D., Favier, A.L., 2007. Genomic sequence of a clonal isolate of the vaccinia virus Lister strain employed for smallpox vaccination in France and its comparison to other orthopoxviruses. *The Journal of general virology* 88, 1906-1916.

Garcel, A., Perino, J., Crance, J.-M., Drillien, R., Garin, D., Favier, A.-L., 2009. Phenotypic and genetic diversity of the traditional Lister smallpox vaccine. *Vaccine* 27, 708-717.

Gerlic, M., Faustin, B., Postigo, A., Yu, E.C., Proell, M., Gombosuren, N., Krajewska, M., Flynn, R., Croft, M., Way, M., Satterthwait, A., Liddington, R.C., Salek-Ardakani, S., Matsuzawa, S., Reed, J.C., 2013. Vaccinia virus F1L protein promotes virulence by inhibiting inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 7808-7813.

Gershon, P.D., Ahn, B.Y., Garfield, M., Moss, B., 1991. Poly(A) polymerase and a dissociable polyadenylation stimulatory factor encoded by vaccinia virus. *Cell* 66, 1269-1278.

Gershon, P.D., Moss, B., 1990. Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4401-4405.

Gilbert, S.C., 2013. Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. *Vaccine*.

Giulio, D.B.D., Eckburg, P.B., 2004. Reviews Human monkeypox : an emerging zoonosis. 4, 15-25.

Gomez-cambronero, J., 2011. New concepts in PLD signaling in inflammation and cancer. 1356-1369.

González, J.M., Esteban, M., 2010. A poxvirus Bcl-2-like gene family involved in regulation of host immune response: sequence similarity and evolutionary history. *Virology journal* 7, 59.

Graham, K.A., Lalani, A.S., Macen, J.L., Ness, T.L., Barry, M., Liu, L.Y., Lucas, A., Clark-Lewis, I., Moyer, R.W., McFadden, G., 1997. The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology* 229, 12-24.

Hanke, T., McMichael, A.J., Mwau, M., Wee, E.G.-T., Ceberej, I., Patel, S., Sutton, J., Tomlinson, M., Samuel, R.V., 2002. Development of a DNA-MVA/HIVA vaccine for Kenya. *Vaccine* 20, 1995-1998.

Hansen, H., Okeke, M.I., Nilssen, Ø., Traavik, T., 2009. Comparison and phylogenetic analysis of cowpox viruses isolated from cats and humans in Fennoscandia. *Archives of virology* 154, 1293-1302.

Harrison, S.C., Alberts, B., Ehrenfeld, E., Enquist, L., Fineberg, H., McKnight, S.L., Moss, B., O'Donnell, M., Ploegh, H., Schmid, S.L., Walter, K.P., Theriot, J., 2004. Discovery of antivirals against smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11178-11192.

Harte, M.T., Haga, I.R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P.C., Bartlett, N.W., Smith, G.L., Bowie, A., O'Neill, L.A., 2003. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *The Journal of experimental medicine* 197, 343-351.

Hawkrige, T., Scriba, T.J., Gelderbloem, S., Smit, E., Tameris, M., Moyo, S., Lang, T., Veldsman, A., Hatherill, M., Merwe, L.v.d., Fletcher, H.A., Mahomed, H., Hill, A.V.S., Hanekom, W.A., Hussey, G.D., McShane, H., 2008. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *The Journal of infectious diseases* 198, 544-552.

Hayden, M.S., Ghosh, S., 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.

Hemmer, C.J., Littmann, M., Löbermann, M., Meyer, H., Petschaelis, A., Reisinger, E.C., 2010. Human cowpox virus infection acquired from a circus elephant in Germany. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 14 Suppl 3, e338-340.

Henderson, D.A., 2011. Smallpox virus destruction and the implications of a new vaccine. *Biosecurity and bioterrorism : biodefense strategy, practice, and science* 9, 163-168.

Herder, V., Wohlsein, P., Grunwald, D., Janssen, H., Meyer, H., Kaysser, P., Baumgärtner, W., Beineke, A., 2011. Poxvirus infection in a cat with presumptive human transmission. *Veterinary dermatology* 22, 220-224.

Hilleman, M.R., 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 Suppl 14560-14566.

Honeychurch, K.M., Yang, G., Jordan, R., Hruby, D.E., 2007. The vaccinia virus F13L YPPL motif is required for efficient release of extracellular enveloped virus. *Journal of Virology* 81, 7310-7315.

Howard, A.R., Senkevich, T.G., Moss, B., 2008. Vaccinia virus A26 and A27 proteins form a stable complex tethered to mature virions by association with the A17 transmembrane protein. *Journal of virology* 82, 12384-12391.

Howard, A.R., Weisberg, A.S., Moss, B., 2010. Congregation of orthopoxvirus virions in cytoplasmic A-type inclusions is mediated by interactions of a bridging protein (A26p) with a matrix protein (AT1p) and a virion membrane-associated protein (A27p). *Journal of Virology* 84, 7592-7602.

Hsiao, J.C., Chung, C.S., Chang, W., 1999. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *Journal of virology* 73, 8750-8761.

Hu, F.Q., Smith, C.A., Pickup, D.J., 1994. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* 204, 343-356.

Huang, J., Huang, Q., Zhou, X., Shen, M.M., Yen, A., Yu, S.X., Dong, G., Qu, K., Huang, P., Anderson, E.M., Daniel-Issakani, S., Buller, R.M.L., Payan, D.G., Lu, H.H., 2004. The poxvirus p28 virulence factor is an E3 ubiquitin ligase. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 54110-54116.

Huang, J., Smirnov, S.V., Lewis-Antes, A., Balan, M., Li, W., Tang, S., Silke, G.V., Pütz, M.M., Smith, G.L., Kotenko, S.V., 2007. Inhibition of type I and type III interferons by a secreted glycoprotein from Yaba-like disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9822-9827.

Huggins, J., Goff, A., Hensley, L., Mucker, E., Shamblin, J., Wlazlowski, C., Johnson, W., Chapman, J., Larsen, T., Twenhafel, N., Karem, K., Damon, I.K., Byrd, C.M., Bolken, T.C., Jordan, R., Hruby, D., 2009. Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2620-2625.

Hughes, A.L., 2002. Origin and evolution of viral interleukin-10 and other DNA virus genes with vertebrate homologues. *Journal of molecular evolution* 54, 90-101.

Hughes, A.L., Friedman, R., 2005. Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35, 186-195.

Hughes, A.L., Irausquin, S., Friedman, R., 2010. The evolutionary biology of poxviruses. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 10, 50-59.

- Husain, M., Weisberg, A., Moss, B., 2003. Topology of epitope-tagged F13L protein, a major membrane component of extracellular vaccinia virions. *Virology* 308, 233-242.
- Huse, S.M., Huber, J.a., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Welch, D.M., 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome biology* 8, R143.
- Huson, D.H., Auch, A.F., Qi, J., Schuster, S.C., 2007. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res* 17, 377-386.
- Hutin, Y.J., Williams, R.J., Malfait, P., Pebody, R., Loparev, V.N., Ropp, S.L., Rodriguez, M., Knight, J.C., Tshioko, F.K., Khan, A.S., Szczeniowski, M.V., Esposito, J.J., 2001. Outbreak of human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 1996 to 1997. *Emerging Infectious Diseases* 7, 434-438.
- Ichihashi, Y., Matsumoto, S., 1966. Studies on the nature of Marchal bodies (A-type inclusion) during ectromelia virus infection. *Virology* 29, 264-275.
- Ishii, K., Moss, B., 2001. Role of vaccinia virus A20R protein in DNA replication: construction and characterization of temperature-sensitive mutants. *Journal of Virology* 75, 1656-1663.
- Iyer, L.M., Balaji, S., Koonin, E.V., Aravind, L., 2006. Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus research* 117, 156-184.
- Izmailyan, R.A., Huang, C.Y., Mohammad, S., Isaacs, S.N., Chang, W., 2006. The envelope G3L protein is essential for entry of vaccinia virus into host cells. *Journal of Virology* 80, 8402-8410.
- Jacobs, B.L., Langland, J.O., Kibler, K.V., Denzler, K.L., White, S.D., Holechek, S.A., Wong, S., Huynh, T., Baskin, C.R., 2009. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral research* 84, 1-13.
- Jahrling, P.B., Hensley, L.E., Martinez, M.J., Leduc, J.W., Rubins, K.H., Relman, D.A., Huggins, J.W., 2004. Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15196-15200.
- Kara, P.D., Afonso, C.L., Wallace, D.B., Kutish, G.F., Abolnik, C., Lu, Z., Vreede, F.T., Taljaard, L.C., Zsak, A., Viljoen, G.J., Rock, D.L., 2003. Comparative sequence analysis of the South African vaccine strain and two virulent field isolates of Lumpy skin disease virus. *Archives of Virology* 148, 1335-1356.
- Karupiah, G., Buller, R.M., Van Rooijen, N., Duarte, C.J., Chen, J., 1996. Different roles for CD4+ and CD8+ T lymphocytes and macrophage subsets in the control of a generalized virus infection. *Journal of virology* 70, 8301-8309.
- Kato, S.E., Condit, R.C., Moussatche, N., 2007. The vaccinia virus E8R gene product is required for formation of transcriptionally active virions. *Virology* 367, 398-412.
- Katsafanas, G.C., Moss, B., 1999. Histidine codons appended to the gene encoding the RPO22 subunit of vaccinia virus RNA polymerase facilitate the isolation and purification of functional enzyme and associated proteins from virus-infected cells. *Virology* 258, 469-479.
- Kaysser, P., von Bomhard, W., Dobrzykowski, L., Meyer, H., 2010. Genetic diversity of feline cowpox virus, Germany 2000-2008. *Vet Microbiol* 141, 282-288.

Keck, J.G., Baldick, C.J., Jr., Moss, B., 1990. Role of DNA replication in vaccinia virus gene expression: a naked template is required for transcription of three late trans-activator genes. *Cell* 61, 801-809.

Kenner, J., Cameron, F., Empig, C., Jobes, D.V., Gurwith, M., 2006. LC16m8: an attenuated smallpox vaccine. *Vaccine* 24, 7009-7022.

Kettle, S., Alcamí, A., Khanna, A., Ehret, R., Jassoy, C., Smith, G.L., 1997. Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1 β -converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1 β -induced fever. *The Journal of general virology* 78 (Pt 3), 677-685.

Khodakevich, L., Jezek, Z., Kinzanzka, K., 1986. Isolation of monkeypox virus from wild squirrel infected in nature. *Lancet* 1, 98-99.

Kluczyk, A., Siemion, I.Z., Szewczuk, Z., Wieczorek, Z., 2002. The immunosuppressive activity of peptide fragments of vaccinia virus C10L protein and a hypothesis on the role of this protein in the viral invasion. *Peptides* 23, 823-834.

Kochan, G., Escors, D., González, J.M., Casasnovas, J.M., Esteban, M., 2008. Membrane cell fusion activity of the vaccinia virus A17-A27 protein complex. *Cellular microbiology* 10, 149-164.

Kochneva, G., Kolosova, I., Maksyutova, T., Ryabchikova, E., Shchelkunov, S., 2005. Effects of deletions of kelch-like genes on cowpox virus biological properties. *Archives of virology* 150, 1857-1870.

Kochneva, G.V., Kolosova, I.V., Lupan, T.a., Sivolobova, G.F., Yudin, P.V., Grazhdantseva, a.a., Ryabchikova, E.I., Kandrina, N.Y., Shchelkunov, S.N., 2009. Orthopoxvirus genes for Kelch-like proteins: III. Construction of Mousepox (ectromelia) virus variants with targeted gene deletions. *Molecular Biology* 43, 567-572.

Kotwal, G.J., Moss, B., 1988. Analysis of a large cluster of nonessential genes deleted from a vaccinia virus terminal transposition mutant. *Virology* 167, 524-537.

Labelle, P., Hahn, N.E., Fraser, J.K., Kendall, L.V., Ziman, M., James, E., Shastri, N., Griffey, S.M., 2009. Mousepox detected in a research facility: case report and failure of mouse antibody production testing to identify Ectromelia virus in contaminated mouse serum. *Comparative medicine* 59, 180-186.

Laidlaw, S.M., Skinner, M.a., 2004. Comparison of the genome sequence of FP9, an attenuated, tissue culture-adapted European strain of Fowlpox virus, with those of virulent American and European viruses. *The Journal of general virology* 85, 305-322.

Lalani, A.S., Graham, K., Mossman, K., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., Kelvin, D., McFadden, G., 1997. The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *Journal of virology* 71, 4356-4363.

Lalani, A.S., McFadden, G., 1997. Secreted poxvirus chemokine binding proteins. *Journal of leukocyte biology* 62, 570-576.

Latner, D.R., Thompson, J.M., Gershon, P.D., Storrs, C., Condit, R.C., 2002. The Positive Transcription Elongation Factor Activity of the Vaccinia Virus J3 Protein Is Independent from Its (Nucleoside-2' -O-) Methyltransferase and Poly(A) Polymerase Stimulatory Functions. *Virology* 301, 64-80.

Lefkowitz, E.J., Wang, C., Upton, C., 2006. Poxviruses: past, present and future. *Virus Research* 117, 105-118.

Li, G., Chen, N., Feng, Z., Buller, R.M., Osborne, J., Harms, T., Damon, I., Upton, C., Esteban, D.J., 2006a. Genomic sequence and analysis of a vaccinia virus isolate from a patient with a smallpox vaccine-related complication. *Virology Journal* 3, 88.

Li, G., Chen, N., Feng, Z., Buller, R.M.L., Osborne, J., Harms, T., Damon, I., Upton, C., Esteban, D.J., 2006b. Genomic sequence and analysis of a vaccinia virus isolate from a patient with a smallpox vaccine-related complication. *Virology journal* 3, 88.

Li, Y., Carroll, D.S., Gardner, S.N., Walsh, M.C., Vitalis, E.a., Damon, I.K., 2007. On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15787-15792.

Lin, Z., Wang, X., Strong, M.J., Concha, M., Baddoo, M., Xu, G., Baribault, C., Fewell, C., Hulme, W., Hedges, D., Taylor, C.M., Flemington, E.K., 2013. Whole-genome sequencing of the Akata and Mutu Epstein-Barr virus strains. *Journal of virology* 87, 1172-1182.

Lipman, N.S., Nguyen, H., Perkins, S., 1999. Mousepox: a threat to mouse colonies. *Laboratory animals* 33, 304.

Lipman, N.S., Perkins, S., Nguyen, H., Pfeffer, M., Meyer, H., 2000. Mousepox resulting from use of ectromelia virus-contaminated, imported mouse serum. *Comparative medicine* 50, 426-435.

Loparev, V.N., Parsons, J.M., Knight, J.C., Panus, J.F., Ray, C.A., Buller, R.M., Pickup, D.J., Esposito, J.J., 1998. A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3786-3791.

López-Bueno, A., Tamames, J., Velázquez, D., Moya, A., Quesada, A., Alcamí, A., 2009. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. *Science (New York, N.Y.)* 326, 858-861.

Lüttichau, H.R., Stine, J., Boesen, T.P., Johnsen, A.H., Chantry, D., Gerstoft, J., Schwartz, T.W., 2000. A highly selective CC chemokine receptor (CCR)8 antagonist encoded by the poxvirus mollusum contagiosum. *The Journal of experimental medicine* 191, 171-180.

Maa, J., Rodriguez, J., Esteban, M., 1990. Structural and Functional Characterization of a Cell Surface Binding Protein of Vaccinia Virus. *Journal of Biological Chemistry*.

Mahnel, H., 1983. [Disinfection for viruses]. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B* 30, 81-96.

Mahy, B.W., Almond, J.W., Berns, K.I., Chanock, R.M., Lvov, D.K., Pettersson, R.F., Schatzmayr, H.G., Fenner, F., 1993. The remaining stocks of smallpox virus should be destroyed. *Science* 262, 1223-1224.

Maluquer de Motes, C., Cooray, S., Ren, H., Almeida, G.M.F., McGourty, K., Bahar, M.W., Stuart, D.I., Grimes, J.M., Graham, S.C., Smith, G.L., 2011. Inhibition of apoptosis and NF- κ B activation by vaccinia protein N1 occur via distinct binding surfaces and make different contributions to virulence. *PLoS pathogens* 7, e1002430.

Marchal, J., 1930. Infectious ectromelia. A hitherto undescribed virus disease of mice. *The Journal of pathology and bacteriology* XXXIII, 713-728.

Maruri-Avidal, L., Domi, A., Weisberg, A.S., Moss, B., 2011. Participation of vaccinia virus I2 protein in the formation of crescent membranes and immature virions. *Journal of Virology* 85, 2504-2511.

Mavian, C., Lopez-Bueno, A., Balseiro, A., Casais, R., Alcami, A., Alejo, A., 2012a. The genome sequence of the emerging common midwife toad virus identifies an evolutionary intermediate within ranaviruses. *Journal of Virology* 86, 3617-3625.

Mavian, C., Lopez-Bueno, A., Fernandez Somalo, M.P., Alcami, A., Alejo, A., 2012b. Complete genome sequence of the European sheatfish virus. *Journal of Virology* 86, 6365-6366.

McFadden, G., 2005. Poxvirus tropism. *Nature reviews. Microbiology* 3, 201-213.

McKelvey, T.a., Andrews, S.C., Miller, S.E., Ray, C.a., Pickup, D.J., 2002. Identification of the Orthopoxvirus p4c Gene, Which Encodes a Structural Protein That Directs Intracellular Mature Virus Particles into A-Type Inclusions. *Journal of Virology* 76, 11216-11225.

McLysaght, A., Baldi, P.F., Gaut, B.S., 2003. Extensive gene gain associated with adaptive evolution of poxviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15655-15660.

Meisinger-Henschel, C., Schmidt, M., Lukassen, S., Linke, B., Krause, L., Konietzny, S., Goesmann, A., Howley, P., Chaplin, P., Suter, M., Hausmann, J., 2007. Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *The Journal of general virology* 88, 3249-3259.

Melo-Silva, C.R., Tscharke, D.C., Lobigs, M., Koskinen, A., Wong, Y.C., Buller, R.M., Müllbacher, A., Regner, M., 2011. The ectromelia virus SPI-2 protein causes lethal mousepox by preventing NK cell responses. *Journal of virology* 85, 11170-11182.

Mendez-Rios, J.D., Martens, C.a., Bruno, D.P., Porcella, S.F., Zheng, Z.-M., Moss, B., 2012. Genome sequence of erythromelalgia-related poxvirus identifies it as an ectromelia virus strain. *PloS one* 7, e34604.

Meng, X., Embry, A., Sochia, D., Xiang, Y., 2007. Vaccinia virus A6L encodes a virion core protein required for formation of mature virion. *Journal of Virology* 81, 1433-1443.

Meng, X., Jiang, C., Arsenio, J., Dick, K., Cao, J., Xiang, Y., 2009. Vaccinia virus K1L and C7L inhibit antiviral activities induced by type I interferons. *Journal of virology* 83, 10627-10636.

Mercer, A.a., Fleming, S.B., Ueda, N., 2005. F-box-like domains are present in most poxvirus ankyrin repeat proteins. *Virus genes* 31, 127-133.

Mercer, J., Snijder, B., Sacher, R., Burkard, C., Bleck, C.K.E., Stahlberg, H., Pelkmans, L., Helenius, A., 2012. RNAi screening reveals proteasome- and Cullin3-dependent stages in vaccinia virus infection. *Cell reports* 2, 1036-1047.

Mercer, J., Traktman, P., 2003. Investigation of structural and functional motifs within the vaccinia virus A14 phosphoprotein, an essential component of the virion membrane. *Journal of Virology* 77, 8857-8871.

Mercer, J., Traktman, P., 2005. Genetic and cell biological characterization of the vaccinia virus A30 and G7 phosphoproteins. *Journal of Virology* 79, 7146-7161.

Meyer, H., Perrichot, M., Stemmler, M., Emmerich, P., Schmitz, H., Varaine, F., Shungu, R., Tshioko, F., Formenty, P., 2002. Outbreaks of disease suspected of being due to human monkeypox virus infection in the Democratic Republic of Congo in 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2919-2921.

Meyer, H., Rziha, H.J., 1993. Characterization of the gene encoding the A-type inclusion protein of camelpox virus and sequence comparison with other orthopoxviruses. *The Journal of general virology* 74 (Pt 8), 1679-1684.

Meyer, H., Totmenin, A., Gavrilova, E., Shchelkunov, S., 2005. Variola and camelpox virus-specific sequences are part of a single large open reading frame identified in two German cowpox virus strains. *Virus Research* 108, 39-43.

Friesen, P.D. (2007). Insect Viruses. In: *Fields Virology*, (B.N. Fields, D.M. Knipe, and P. Howley, eds), pp. 709-721. Lippincott-Raven, New York.

Mitsubishi, W., Asano, S., Miyamoto, K., Wada, S., 2013. Further research on the biological function of inclusion bodies of *Anomala cuprea* entomopoxvirus, with special reference to the effect on the insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* formulation. *Pest management science*.

Mohamed, M.R., Latner, D.R., Condit, R.C., Niles, E.G., 2001. Interaction between the J3R subunit of vaccinia virus poly(A) polymerase and the H4L subunit of the viral RNA polymerase. *Virology* 280, 143-152.

Mohamed, M.R., Rahman, M.M., Rice, A., Moyer, R.W., Werden, S.J., McFadden, G., 2009. Cowpox virus expresses a novel ankyrin repeat NF-kappaB inhibitor that controls inflammatory cell influx into virus-infected tissues and is critical for virus pathogenesis. *Journal of Virology* 83, 9223-9236.

Montanuy, I., Alejo, A., Alcamí, A., 2011. Glycosaminoglycans mediate retention of the poxvirus type I interferon binding protein at the cell surface to locally block interferon antiviral responses. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 1960-1971.

Morgan, J.R., Cohen, L.K., Roberts, B.E., 1984. Identification of the DNA sequences encoding the large subunit of the mRNA-capping enzyme of vaccinia virus. *Journal of Virology* 52, 206-214.

Morikawa, S., Sakiyama, T., Hasegawa, H., Saijo, M., Maeda, A., Kurane, I., Maeno, G., Kimura, J., Hirama, C., Yoshida, T., Asahi-Ozaki, Y., Sata, T., Kurata, T., Kojima, A., 2005. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *Journal of Virology* 79, 11873-11891.

Moss, B., 2007. Poxviridae: the viruses and their replication. In: *Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E. (Eds.), Fields virology*, vol. 2, fourth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2905–2930.

Moss, B., 2012. Poxvirus cell entry: how many proteins does it take? *Viruses* 4, 688-707.

Mossman, K., Lee, S.F., Barry, M., Boshkov, L., McFadden, G., 1996. Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. *Journal of Virology* 70, 4394-4410.

Mossman, K., Upton, C., McFadden, G., 1995. The myxoma virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner. *The Journal of biological chemistry* 270, 3031-3038.

- Müllbacher, A., Hla, R.T., Museteanu, C., Simon, M.M., 1999a. Perforin is essential for control of ectromelia virus but not related poxviruses in mice. *Journal of virology* 73, 1665-1667.
- Müllbacher, A., Waring, P., Tha Hla, R., Tran, T., Chin, S., Stehle, T., Museteanu, C., Simon, M.M., 1999b. Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13950-13955.
- Mutsafi, Y., Zauberman, N., Sabanay, I., Minsky, A., 2010. Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5978-5982.
- Myskiw, C., Arsenio, J., Hammett, C., van Bruggen, R., Deschambault, Y., Beausoleil, N., Babiuk, S., Cao, J., 2011. Comparative analysis of poxvirus orthologues of the vaccinia virus E3 protein: modulation of protein kinase R activity, cytokine responses, and virus pathogenicity. *Journal of virology* 85, 12280-12291.
- Nagasse-Sugahara, T.K., Kisielius, J.J., Ueda-Ito, M., Curti, S.P., Figueiredo, C.A., Cruz, A.S., Silva, M.M.J., Ramos, C.H., Silva, M.C.C., Sakurai, T., Salles-Gomes, L.F., 2004. Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46, 315-322.
- Najarro, P., Lee, H.-J., Fox, J., Pease, J., Smith, G.L., 2003. Yaba-like disease virus protein 7L is a cell-surface receptor for chemokine CCL1. *The Journal of general virology* 84, 3325-3336.
- Najarro, P., Traktman, P., Lewis, J.A., 2001. Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *Journal of virology* 75, 3185-3196.
- Newsome, T.P., Scaplehorn, N., Way, M., 2004. SRC mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. *Science (New York, N.Y.)* 306, 124-129.
- Ng, A., Tscharke, D.C., Reading, P.C., Smith, G.L., 2001. The vaccinia virus A41L protein is a soluble 30 kDa glycoprotein that affects virus virulence. *The Journal of general virology* 82, 2095-2105.
- Nichols, R.J., Stanitsa, E., Unger, B., Traktman, P., 2008. The vaccinia virus gene I2L encodes a membrane protein with an essential role in virion entry. *Journal of Virology* 82, 10247-10261.
- Niles, E.G., Lee-Chen, G.J., Shuman, S., Moss, B., Broyles, S.S., 1989. Vaccinia virus gene D12L encodes the small subunit of the viral mRNA capping enzyme. *Virology* 172, 513-522.
- Ninove, L., Domart, Y., Vervel, C., Voinot, C., Salez, N., Raoult, D., Meyer, H., Capek, I., Zandotti, C., Charrel, R.N., 2009. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerging Infectious Diseases* 15, 781-784.
- Odom, M., Hendrickson, R.C., Lefkowitz, E., 2009. Poxvirus protein evolution: Family-wide assessment of possible horizontal gene transfer events. *Virus research* 144, 233-249.
- Oh, J., Broyles, S.S., 2005. Host cell nuclear proteins are recruited to cytoplasmic vaccinia virus replication complexes. *Journal of virology* 79, 12852-12860.

- Ohradanova, A., Vullo, D., Kopacek, J., Temperini, C., Betakova, T., Pastorekova, S., Pastorek, J., Supuran, C.T., 2007. Reconstitution of carbonic anhydrase activity of the cell-surface-binding protein of vaccinia virus. *The Biochemical journal* 407, 61-67.
- Ojeda, S., Domi, A., Moss, B., 2006a. Vaccinia virus G9 protein is an essential component of the poxvirus entry-fusion complex. *Journal of Virology* 80, 9822-9830.
- Ojeda, S., Senkevich, T.G., Moss, B., 2006b. Entry of vaccinia virus and cell-cell fusion require a highly conserved cysteine-rich membrane protein encoded by the A16L gene. *Journal of Virology* 80, 51-61.
- Okeke, M.I., Adekoya, O.a., Moens, U., Tryland, M., Traavik, T., Nilssen, Ø., 2009. Comparative sequence analysis of A-type inclusion (ATI) and P4c proteins of orthopoxviruses that produce typical and atypical ATI phenotypes. *Virus genes* 39, 200-209.
- Okeke, M.I., Hansen, H., Traavik, T., 2012. A naturally occurring cowpox virus with an ectromelia virus A-type inclusion protein gene displays atypical A-type inclusions. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12, 160-168.
- Osborne, J.D., Da Silva, M., Frace, a.M., Sammons, S.a., Olsen-Rasmussen, M., Upton, C., Buller, R.M.L., Chen, N., Feng, Z., Roper, R.L., Liu, J., Pougatcheva, S., Chen, W., Wohlhueter, R.M., Esposito, J.J., 2007. Genomic differences of Vaccinia virus clones from Dryvax smallpox vaccine: the Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. *Vaccine* 25, 8807-8832.
- Osterrieder, N., Meyer, H., Pfeffer, M., 1994. Characterization of the gene encoding the A-type inclusion body protein of mousepox virus. *Virus genes* 8, 125-135.
- Panchanathan, V., Chaudhri, G., Karupiah, G., 2008. Correlates of protective immunity in poxvirus infection: where does antibody stand? *Immunology and cell biology* 86, 80-86.
- Panus, J.F., Smith, C.A., Ray, C.A., Smith, T.D., Patel, D.D., Pickup, D.J., 2002. Cowpox virus encodes a fifth member of the tumor necrosis factor receptor family: a soluble, secreted CD30 homologue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8348-8353.
- Paran, N., Sutter, G., 2009. Smallpox vaccines: New formulations and revised strategies for vaccination. *Human vaccines* 5, 824-831.
- Parker, A.K., Parker, S., Yokoyama, W.M., Corbett, J.A., Buller, R.M.L., 2007. Induction of natural killer cell responses by ectromelia virus controls infection. *Journal of virology* 81, 4070-4079.
- Parker, R.F., Bronson, L.H., Green, R.H., 1941. FURTHER STUDIES OF THE INFECTIOUS UNIT OF VACCINIA. *The Journal of experimental medicine* 74, 263-281.
- Parker, S., Siddiqui, A.M., Painter, G., Schriewer, J., Buller, R.M., 2010. Ectromelia virus infections of mice as a model to support the licensure of anti-orthopoxvirus therapeutics. *Viruses* 2, 1918-1932.
- Parkinson, J.E., Sanderson, C.M., Smith, G.L., 1995. The vaccinia virus A38L gene product is a 33-kDa integral membrane glycoprotein. *Virology* 214, 177-188.
- Parrish, S., Resch, W., Moss, B., 2007. Vaccinia virus D10 protein has mRNA decapping activity , providing a mechanism for control of host and viral gene expression. 104, 2139-2144.

Patel, D.D., Pickup, D.J., Joklik, W.K., 1986. Isolation of cowpox virus A-type inclusions and characterization of their major protein component. *Virology* 149, 174-189.

Perdiguerro, B., Esteban, M., 2009. The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29, 581-598.

Perkus, M.E., Goebel, S.J., Davis, S.W., Johnson, G.P., Norton, E.K., Paoletti, E., 1991. Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology* 180, 406-410.

Pfeffer, M., Meyer, H., Wernery, U., Kaaden, O.R., 1996. Comparison of camelpox viruses isolated in Dubai. *Vet Microbiol* 49, 135-146.

Pires de Miranda, M., 2003. The vaccinia virus kelch-like protein C2L affects calcium-independent adhesion to the extracellular matrix and inflammation in a murine intradermal model. *Journal of General Virology* 84, 2459-2471.

Qin, L., Liang, M., Evans, D.H., 2013. Genomic analysis of vaccinia virus strain TianTan provides new insights into the evolution and evolutionary relationships between Orthopoxviruses. *Virology*.

Qin, L., Upton, C., Hazes, B., Evans, D.H., 2011. Genomic analysis of the vaccinia virus strain variants found in Dryvax vaccine. *Journal of virology* 85, 13049-13060.

Quan, L.T., Caputo, A., Bleackley, R.C., Pickup, D.J., Salvesen, G.S., 1995. Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *The Journal of biological chemistry* 270, 10377-10379.

Quick, S.D., Broyles, S.S., 1990. Vaccinia virus gene D7R encodes a 20,000-dalton subunit of the viral DNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 178, 603-605.

Radford, A.D., Chapman, D., Dixon, L., Chantrey, J., Darby, A.C., Hall, N., 2012. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *The Journal of general virology* 93, 1853-1868.

Randall, C.C., Gafford, L.G., Darlington, R.W., Hyde, J., 1964. Composition of fowlpox virus and inclusion matrix. *Journal of bacteriology* 87, 939-944.

Ray, C.A., Black, R.A., Kronheim, S.R., Greenstreet, T.A., Sleath, P.R., Salvesen, G.S., Pickup, D.J., 1992. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69, 597-604.

Reading, P.C., Symons, J.a., Smith, G.L., 2003. A soluble chemokine-binding protein from vaccinia virus reduces virus virulence and the inflammatory response to infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170, 1435-1442.

Reed, K.D., Melski, J.W., Graham, M.B., Regnery, R.L., Sotir, M.J., Wegner, M.V., Kazmierczak, J.J., Stratman, E.J., Li, Y., Fairley, J.A., Swain, G.R., Olson, V.A., Sargent, E.K., Kehl, S.C., Frace, M.A., Kline, R., Foldy, S.L., Davis, J.P., Damon, I.K., 2004. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *The New England journal of medicine* 350, 342-350.

Resch, W., Moss, B., 2005. The Conserved Poxvirus L3 Virion Protein Is Required for Transcription of Vaccinia Virus Early Genes. 79, 14719-14729.

- Resch, W., Weisberg, A.S., Moss, B., 2005. Vaccinia virus nonstructural protein encoded by the A11R gene is required for formation of the virion membrane. *Journal of Virology* 79, 6598-6609.
- Rietdorf, J., Ploubidou, A., Reckmann, I., Holmstrom, A., Frischknecht, F., Zettl, M., Zimmermann, T., Way, M., 2001. Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat Cell Biol* 3, 992-1000.
- Rimoin, A.W., KISALU, N., Kebela-Ilunga, B., Mukaba, T., Wright, L.L., Formenty, P., Wolfe, N.D., Shongo, R.L., Tshioko, F., Okitolonda, E., Muyembe, J.J., Ryder, R., Meyer, H., 2007. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001-2004. *Emerging Infectious Diseases* 13, 934-937.
- Rimoin, A.W., Mulembakani, P.M., Johnston, S.C., Lloyd Smith, J.O., KISALU, N.K., Kinkela, T.L., Blumberg, S., Thomassen, H.A., Pike, B.L., Fair, J.N., Wolfe, N.D., Shongo, R.L., Graham, B.S., Formenty, P., Okitolonda, E., Hensley, L.E., Meyer, H., Wright, L.L., Muyembe, J.-J., 2010. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 16262-16267.
- Roberts, K.L., Smith, G.L., 2008. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends in Microbiology* 16, 472-479.
- Rohwer, F., Thurber, R.V., 2009. Viruses manipulate the marine environment. *Nature* 459, 207-212.
- Rosales, R., Harris, N., Ahn, B.Y., Moss, B., 1994. Purification and identification of a vaccinia virus-encoded intermediate stage promoter-specific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor SII (TFIIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 14260-14267.
- Rosenthal, S.R., Merchlinsky, M., Kleppinger, C., Goldenthal, K.L., 2001. Developing new smallpox vaccines. *Emerging infectious diseases* 7, 920-926.
- Ruiz-Argüello, M.B., Smith, V.P., Campanella, G.S.V., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Luster, A.D., Alcamí, A., 2008. An Ectromelia Virus Protein That Interacts with Chemokines through Their Glycosaminoglycan Binding Domain. *Journal of Virology* 82, 917-926.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16, 944-945.
- Sakala, I.G., Chaudhri, G., Buller, R.M., Nuara, A.a., Bai, H., Chen, N., Karupiah, G., 2007. Poxvirus-encoded gamma interferon binding protein dampens the host immune response to infection. *Journal of Virology* 81, 3346-3353.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocumbe, P.M., Smith, M., 1977a. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687-695.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977b. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Sanz, P., Moss, B., 1999. Identification of a transcription factor, encoded by two vaccinia virus early genes, that regulates the intermediate stage of viral gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2692-2697.

Saraiva, M., Alcami, A., 2001. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *Journal of virology* 75, 226-233.

Saraiva, M., Smith, P., Fallon, P.G., Alcami, A., 2002. Inhibition of type 1 cytokine-mediated inflammation by a soluble CD30 homologue encoded by ectromelia (mousepox) virus. *The Journal of experimental medicine* 196, 829-839.

Satheshkumar, P.S., Anton, L.C., Sanz, P., Moss, B., 2009a. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system prevents vaccinia virus DNA replication and expression of intermediate and late genes. *Journal of virology* 83, 2469-2479.

Satheshkumar, P.S., Moss, B., 2009. Characterization of a newly identified 35-amino-acid component of the vaccinia virus entry/fusion complex conserved in all chordopoxviruses. *Journal of virology* 83, 12822-12832.

Satheshkumar, P.S., Weisberg, A., Moss, B., 2009b. Vaccinia virus H7 protein contributes to the formation of crescent membrane precursors of immature virions. *Journal of virology* 83, 8439-8450.

Schatzmayr, H.G., Costa, R.V.C., Gonçalves, M.C.R., Barreto, D.F., Batista, V.H., Silva, M.E.V., Brust, L.A.C., Barth, O.M., 2009. [Human infections caused by vaccinia-like poxviruses in Brazil]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42, 672-676.

Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E.J., Shida, H., Hiller, G., Griffiths, G., 1994. Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *Journal of virology* 68, 130-147.

Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R., Barrett, J.W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S.H., Lucas, A., McFadden, G., 2003. Poxviruses and immune evasion. *Annual review of immunology* 21, 377-423.

Senkevich, T.G., Koonin, E.V., Buller, R.M., 1994. A poxvirus protein with a RING zinc finger motif is of crucial importance for virulence. *Virology* 198, 118-128.

Senkevich, T.G., Moss, B., 2005. Vaccinia virus H2 protein is an essential component of a complex involved in virus entry and cell-cell fusion. *Journal of Virology* 79, 4744-4754.

Senkevich, T.G., Ward, B.M., Moss, B., 2004. Vaccinia virus entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. *Journal of Virology* 78, 2357-2366.

Senkevich, T.G., Weisberg, A.S., Moss, B., 2000. Vaccinia virus E10R protein is associated with the membranes of intracellular mature virions and has a role in morphogenesis. *Virology* 278, 244-252.

Senkevich, T.G., White, C.L., Weisberg, A., Granek, J.A., Wolffe, E.J., Koonin, E.V., Moss, B., 2002. Expression of the vaccinia virus A2.5L redox protein is required for virion morphogenesis. *Virology* 300, 296-303.

Shchelkunov, S., Totmenin, A., Kolosova, I., 2002. Species-specific differences in organization of orthopoxvirus kelch-like proteins. *Virus genes* 24, 157-162.

Shchelkunov, S.N., 2009. How long ago did smallpox virus emerge? *Archives of Virology* 154, 1865-1871.

- Shchelkunov, S.N., 2010. Interaction of orthopoxviruses with the cellular ubiquitin-ligase system. *Virus Genes* 41, 309-318.
- Shchelkunov, S.N., 2012. Orthopoxvirus genes that mediate disease virulence and host tropism. *Advances in virology* 2012, 524743.
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 26, 1135-1145.
- Shida, H., Tanabe, K., Matsumoto, S., 1977. Mechanism of virus occlusion into A-type inclusion during poxvirus infection. *Virology* 76, 217-233.
- Shuman, S., Moss, B., 1987. Identification of a vaccinia virus gene encoding a type I DNA topoisomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7478-7482.
- Simpson, D.A., Condit, R.C., 1995. Vaccinia virus gene A18R encodes an essential DNA helicase. *Journal of Virology* 69, 6131-6139.
- Small, J.D., New, A.E., 1981. Prevention and control of mousepox. *Laboratory animal science* 31, 616-629.
- Smith, C.A., Hu, F.Q., Smith, T.D., Richards, C.L., Smolak, P., Goodwin, R.G., Pickup, D.J., 1996. Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT alpha. *Virology* 223, 132-147.
- Smith, G.L., McFadden, G., 2002. Smallpox: anything to declare? *Nature reviews. Immunology* 2, 521-527.
- Smith, G.L., Vanderplasschen, A., 1998. Extracellular enveloped vaccinia virus. Entry, egress, and evasion. *Advances in experimental medicine and biology* 440, 395-414.
- Smith, V.P., Alcami, a., 2000. Expression of secreted cytokine and chemokine inhibitors by ectromelia virus. *Journal of virology* 74, 8460-8471.
- Smith, V.P., Alcami, A., 2002. Inhibition of interferons by ectromelia virus. *Journal of Virology* 76, 1124-1134.
- Smith, V.P., Bryant, N.A., Alcami, A., 2000. Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. *The Journal of general virology* 81, 1223-1230.
- Sonnberg, S., Seet, B.T., Pawson, T., Fleming, S.B., Mercer, A.A., 2008. Poxvirus ankyrin repeat proteins are a unique class of F-box proteins that associate with cellular SCF1 ubiquitin ligase complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10955-10960.
- Sperling, K.M., Schwantes, A., Schnierle, B.S., Sutter, G., 2008. The highly conserved orthopoxvirus 68k ankyrin-like protein is part of a cellular SCF ubiquitin ligase complex. *Virology* 374, 234-239.
- Stanford, M.M., McFadden, G., Karupiah, G., Chaudhri, G., 2007. Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm. *Immunology and cell biology* 85, 93-102.
- Stroobant, P., Rice, A.P., Gullick, W.J., Cheng, D.J., Kerr, I.M., Waterfield, M.D., 1985. Purification and characterization of vaccinia virus growth factor. *Cell* 42, 383-393.

Sung, T.C., Roper, R.L., Zhang, Y., Rudge, S.a., Temel, R., Hammond, S.M., Morris, a.J., Moss, B., Engebrecht, J., Frohman, M.a., 1997. Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *The EMBO journal* 16, 4519-4530.

Symons, J.A., Adams, E., Tschärke, D.C., Reading, P.C., Waldmann, H., Smith, G.L., 2002. The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model. *The Journal of general virology* 83, 2833-2844.

Symons, J.A., Alcami, A., Smith, G.L., 1995. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 81, 551-560.

Takahashi, T., Oie, M., Ichihashi, Y., 1994. N-terminal amino acid sequences of vaccinia virus structural proteins. *Virology* 202, 844-852.

Takemura, M., 2001. Poxviruses and the origin of the eukaryotic nucleus. *Journal of molecular evolution* 52, 419-425.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

Teale, A., Campbell, S., Van Buuren, N., Magee, W.C., Watmough, K., Couturier, B., Shipclark, R., Barry, M., 2009. Orthopoxviruses require a functional ubiquitin-proteasome system for productive replication. *Journal of virology* 83, 2099-2108.

Tisoncik, J.R., Korth, M.J., Simmons, C.P., Farrar, J., Martin, T.R., Katze, M.G., 2012. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 76, 16-32.

Townsley, A.C., Senkevich, T.G., Moss, B., 2005. Vaccinia virus A21 virion membrane protein is required for cell entry and fusion. *Journal of Virology* 79, 9458-9469.

Townsley, A.C., Weisberg, A.S., Wagenaar, T.R., Moss, B., 2006. Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *Journal of virology* 80, 8899-8908.

Tschärke, D.C., Reading, P.C., Smith, G.L., 2002. Dermal infection with vaccinia virus reveals roles for virus proteins not seen using other inoculation routes. *The Journal of general virology* 83, 1977-1986.

Tseng, M., Palaniyar, N., Zhang, W., Evans, D.H., 1999. DNA binding and aggregation properties of the vaccinia virus I3L gene product. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 21637-21644.

Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Sur, J., Sandybaev, N.T., Kerembekova, U.Z., Zaitsev, V.L., Kutish, G.F., Rock, D.L., 2002. The Genomes of Sheeppox and Goatpox Viruses. 76, 6054-6061.

Tulman, E.R., Delhon, G., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Sandybaev, N.T., Kerembekova, U.Z., Zaitsev, V.L., Kutish, G.F., Rock, D.L., 2006. Genome of horsepox virus. *Journal of virology* 80, 9244-9258.

Turner, S., Kenshole, B., Ruby, J., 1999. Viral modulation of the host response via crmA/SPI-2 expression. *Immunology and cell biology* 77, 236-241.

Turner, S.J., Silke, J., Kenshole, B., Ruby, J., 2000. Characterization of the ectromelia virus serpin, SPI-2. *The Journal of general virology* 81, 2425-2430.

- Ulaeto, D., Grosenbach, D., Hruby, D.E., 1996. The vaccinia virus 4c and A-type inclusion proteins are specific markers for the intracellular mature virus particle. *Journal of virology* 70, 3372-3377.
- Unger, B., Nichols, R.J., Stanitsa, E.S., Traktman, P., 2008. Functional characterization of the vaccinia virus I5 protein. *Virology Journal* 5, 148.
- Unger, B., Traktman, P., 2004. Vaccinia virus morphogenesis: a13 phosphoprotein is required for assembly of mature virions. *Journal of Virology* 78, 8885-8901.
- Upton, C., Mossman, K., McFadden, G., 1992. Encoding of a homolog of the IFN-gamma receptor by myxoma virus. *Science (New York, N.Y.)* 258, 1369-1372.
- Upton, C., Slack, S., Hunter, A.L., Roper, R.L., Ehlers, A., 2003. Poxvirus Orthologous Clusters : toward Defining the Minimum Essential Poxvirus Genome. 77, 7590-7600.
- Upton, C., Stuart, D.T., McFadden, G., 1993. Identification of a poxvirus gene encoding a uracil DNA glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 4518-4522.
- Van Buuren, N., Couturier, B., Xiong, Y., Barry, M., 2008a. Ectromelia Virus Encodes a Novel Family of F-Box Proteins That Interact with the SCF Complex. *Journal of Virology* 82, 9917-9927.
- van Buuren, N., Couturier, B., Xiong, Y., Barry, M., 2008b. Ectromelia virus encodes a novel family of F-box proteins that interact with the SCF complex. *Journal of virology* 82, 9917-9927.
- van Eijl, H., Hollinshead, M., Rodger, G., Zhang, W.-H., Smith, G.L., 2002. The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus particles and is required for their egress to the cell surface. *The Journal of general virology* 83, 195-207.
- Van Vliet, K., Mohamed, M.R., Zhang, L., Villa, N.Y., Werden, S.J., Liu, J., McFadden, G., 2009. Poxvirus proteomics and virus-host protein interactions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 73, 730-749.
- Vázquez, M.I., Esteban, M., 1999. Identification of functional domains in the 14-kilodalton envelope protein (A27L) of vaccinia virus. *Journal of virology* 73, 9098-9109.
- Vázquez, M.I., Rivas, G., Cregut, D., Serrano, L., Esteban, M., 1998. The vaccinia virus 14-kilodalton (A27L) fusion protein forms a triple coiled-coil structure and interacts with the 21-kilodalton (A17L) virus membrane protein through a C-terminal alpha-helix. *Journal of virology* 72, 10126-10137.
- Wallace, G.D., 1981. The threat of mouse pox. *J Immunol* 126, 1648.
- Weinrich, S.L., Niles, E.G., Hruby, D.E., 1985. Transcriptional and translational analysis of the vaccinia virus late gene L65. *Journal of Virology* 55, 450-457.
- White, C.L., Senkevich, T.G., Moss, B., 2002. Vaccinia virus G4L glutaredoxin is an essential intermediate of a cytoplasmic disulfide bond pathway required for virion assembly. *Journal of Virology* 76, 467-472.
- Wilton, B.a., Campbell, S., Van Buuren, N., Garneau, R., Furukawa, M., Xiong, Y., Barry, M., 2008. Ectromelia virus BTB/kelch proteins, EVM150 and EVM167, interact with cullin-3-based ubiquitin ligases. *Virology* 374, 82-99.

Wittek, R., 1982. Organization and expression of the poxvirus genome. *Experientia* 38, 285-297.

Wolfe, C.L., Ojeda, S., Moss, B., 2012. Transcriptional repression and RNA silencing act synergistically to demonstrate the function of the eleventh component of the vaccinia virus entry-fusion complex. *Journal of Virology* 86, 293-301.

Xiang, Y., Moss, B., 1999. IL-18 binding and inhibition of interferon gamma induction by human poxvirus-encoded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11537-11542.

Xiang, Y., Simpson, D.A., Spiegel, J., Zhou, A., Silverman, R.H., Condit, R.C., 1998. The vaccinia virus A18R DNA helicase is a postreplicative negative transcription elongation factor. *Journal of Virology* 72, 7012-7023.

Xu, R.-H., Cohen, M., Tang, Y., Lazear, E., Whitbeck, J.C., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., Sigal, L.J., 2008. The orthopoxvirus type I IFN binding protein is essential for virulence and an effective target for vaccination. *The Journal of experimental medicine* 205, 981-992.

Xu, X., Nash, P., McFadden, G., 2000. Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions. *Virus genes* 21, 97-109.

Xue, X., Lu, Q., Wei, H., Wang, D., Chen, D., He, G., Huang, L., Wang, H., Wang, X., 2011. Structural basis of chemokine sequestration by CrmD, a poxvirus-encoded tumor necrosis factor receptor. *PLoS pathogens* 7, e1002162.

Yeh, W.W., Moss, B., Wolffe, E.J., 2000. The vaccinia virus A9L gene encodes a membrane protein required for an early step in virion morphogenesis. *Journal of virology* 74, 9701-9711.

Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 47-59.

Yu, E., Zhai, D., Jin, C., Gerlic, M., Reed, J.C., Liddington, R., 2011. Structural determinants of caspase-9 inhibition by the vaccinia virus protein, F1L. *The Journal of biological chemistry* 286, 30748-30758.

Yuen, K.Y., Wong, S.S., 2005. Human infection by avian influenza A H5N1. *Hong Kong Med J* 11, 189-199.

Zhang, W.H., Wilcock, D., Smith, G.L., 2000. Vaccinia virus F12L protein is required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence. *Journal of Virology* 74, 11654-11662.

Zheng, Z.M., Specter, S., Zhang, J.H., Friedman, H., Zhu, W.P., 1992. Further characterization of the biological and pathogenic properties of erythromelalgia-related poxviruses. *The Journal of general virology* 73 (Pt 8), 2011-2019.

Zheng, Z.M., Zhang, J.H., Hu, J.M., Liu, S.F., Zhu, W.P., 1988. Poxviruses isolated from epidemic erythromelalgia in China. *Lancet* 1, 296.

Zhu, M., Moore, T., Broyles, S.S., 1998. A cellular protein binds vaccinia virus late promoters and activates transcription in vitro. *Journal of Virology* 72, 3893-3899.